



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**REZONANČNÍ PŘENOS ENERGIE V PROSTŘEDÍ  
HYDROGELOVÉ MATRICE**

RESONANCE ENERGY TRANSFER IN THE ENVIRONMENT OF THE HYDROGEL MATRIX

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. David Janča**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1109/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Bc. David Janča**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Rezonanční přenos energie v prostředí hydrogelové matrice

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na studium rezonančního přenosu energie v koloidních systémech, zejména hydrogelech.
2. Na základě rešerše vybrat vhodný pár Donor-Akceptor pro studium agregace ve fázově separovaných hydrogelech v systému hyaluronan-kationaktivní tenzid.
3. Připravit hydrogely o různém obsahu kationaktivního tenzidu a stanovit, jestli v daném systému k přenosu energie dochází.
4. Na základě zjištěných výsledků diskutovat průběh fázové separace při vzniku hydrogelu.

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. David Janča  
student(ka)

-----  
Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá rezonančním přenosem energie v prostředí hydrogelové matrice. V teoretické části práce jsou shrnuty všechny důležité vlastnosti těchto systémů a jejich složek a dále jsou popsány všechny principy pro vysvětlení využívané metody. Práce také obsahuje krátkou literární rešerši.

V experimentální části práce byl měřen rezonanční přenos energie v micelárních roztocích a v hydrogelech v prostředí 0,15 M NaCl. Hydrogely byly tvořeny na základě interakce tenzidu s opačně nabitým polyelektrolytem. Jako kladně nabitý tenzid byl zvolen karbethependeciniumbromid (Septonex) a jako záporně nabitý polyelektrolyt hyaluronan. Jako fluorescenční páry pro RET byly vybrány perylen s fluoresceinem a perylen s DiO.

Bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace akceptorní molekuly zvyšuje i intenzitu RET, neboli míru vázání akceptoru na donor. Při studiu fluorescenčního páru perylenu s DiO bylo pozorováno, že není vhodné fluorescenční sondu DiO využívat při vyšších koncentracích. Byly provedeny experimenty, které měly zjistit, zda dochází ke změnám RET v časovém průběhu od smíchání donorní a akceptorní fluorescenční sondy. Tento jev nebyl potvrzen. U hydrogelů pak byl pozorován vliv zvyšující se koncentrace tenzidu a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Výsledná analýza ukázala, že molekulová hmotnost hyaluronanu má významný vliv na efektivitu RET v hydrogelech.

## ABSTRACT

The diploma thesis deals with resonance energy transfer in hydrogel matrix environment. In the theoretical part, all the important features of these systems and their components are summarized and all the principles for explaining the method used are described. The work also includes a short literary background research.

In the experimental part, the resonance energy transfer was measured in micellar solutions and hydrogels in 0.15 M NaCl medium. The hydrogels were formed on the basis of interaction of the surfactant with the oppositely charged polyelectrolyte. As a positively charged surfactant, carbethependecinium bromide (Septonex) was chosen and hyaluronan as the negatively charged polyelectrolyte. Perylene with fluorescein and perylene were selected as fluorescent pairs for RET.

It has been found that increasing concentration of the acceptor molecule increases the intensity of RET, in other word the rate of acceptor binding to the donor. In the study of fluorescent pair of perylene with DiO was observed, that it was not appropriate to use fluorescence probe DiO at higher concentrations. Experiments were carried out to determine whether RET changes in the time from the point of mixing the donor and acceptor fluorescence probes together. This phenomenon has not been confirmed. In hydrogels, the effect of increasing surfactant concentration and molecular weight of hyaluronan was observed. The resulting analysis showed that the molecular weight of hyaluronan has a significant effect on RET efficiency in hydrogels.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Hydrogel, hyaluronan, septonex, fluorescein, DiO, perylen, fluorescence, rezonanční přenos energie, micely, intenzita, efektivita

## **KEYWORDS**

Hydrogel, hyaluronan, septonex, fluorescein, DiO, perylene, fluorescence, resonance energy transfer, micelles, intensity, effectivity

JANČA, D. *Rezonanční přenos energie v prostředí hydrogelové matrice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

### Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled, konzultace a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Zuzaně Adamcové a Ing. Petře Holínkové za odbornou pomoc při měření práce. Všem děkuji za cenné, komentáře a připomínky.

## OBSAH

1	Úvod.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1.	Tenzidy.....	9
2.1.1.	Struktura a vlastnosti tenzidů .....	9
2.1.2.	Micely .....	10
2.1.3.	Septonex.....	11
2.2.	Gely.....	11
2.2.1.	Vlastnosti a vznik gelů.....	12
2.2.2.	Hydrogely.....	12
2.3.	Hyaluronan .....	12
2.3.1.	Historie a struktura .....	13
2.3.2.	Tvorba polymerních roztoků.....	15
2.3.3.	Metabolismus hyaluronanu a jeho využití .....	15
2.4.	UV-VIS spektrometrie .....	16
2.5.	Fluorescenční spektroskopie .....	16
2.5.1.	Fluorescence.....	17
2.5.2.	Fluorescenční sondy .....	18
2.5.3.	Kvantový výtěžek a doba života fluorescence .....	18
2.5.4.	Zhášení fluorescence.....	20
2.5.4.1.	Dynamické zhášení, Stern-Volmerův vztah.....	21
2.5.4.2.	Statické zhášení .....	22
2.5.4.3.	Kombinované statické a dynamické zhášení .....	23
2.5.5.	Rezonanční přenos energie.....	24
2.5.5.1.	Účinnost přenosu energie.....	25
2.5.5.2.	Určování vzdálenosti pomocí RET .....	26
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	28
3.1.	Rezonanční přenos energie.....	28
3.2.	RET v koloidních systémech.....	28
4	MATERIÁLY A METODY.....	32
4.1.	Materiály .....	32
4.2.	Metody .....	32
4.2.1.	Příprava zásobních roztoků fluoroforů .....	32

4.2.2.	Příprava vzorků pro měření doby života.....	32
4.2.3.	Příprava gelů pro měření rezonančního přenosu energie.....	32
4.3.	Měření .....	33
4.4.	Vlastnosti použitých fluoroforů a jejich spektra .....	33
4.4.1.	Perylen .....	33
4.4.2.	Fluorescein .....	34
4.4.3.	DiO.....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	36
5.1.	Sledování RET mezi perylenem a fluoresceinem a vliv různých koncentrací.....	36
5.2.	Časový vliv na přenos energie.....	38
5.3.	Sledování RET mezi perylenem a DiO .....	38
5.4.	Měření RET v hyaluronanových hydrogelech .....	40
6	Závěr .....	49
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	51
8	POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	56
8.1.	Seznam zkratk.....	56
8.2.	Seznam symbolů .....	56
9	Seznam příloh .....	57
10	Přílohy .....	58

# 1 ÚVOD

Hydrogely jsou gely složené z vysokomolekulárních látek, kde disperzní prostředí tvoří voda. Mají opravdu široké využití. V medicínských a farmaceutických aplikacích se používají jako kontaktní čočky, obvazy, implantáty nebo nosiče léčiv. Tato práce využívá pro přípravu hydrogelů interakce kationaktivního tenzidu s hyaluronanem v prostředí 0,15 M NaCl, jakožto modelu fyziologického roztoku. Tyto gely jsou stabilní a díky hyaluronanu vysoce biokompatibilní. O tento typ gelu se v poslední době výzkum hodně zajímá, protože nabízí velice slibné využití v medicíně, primárně jako matrice pro tvorbu obvazů a zároveň jako nosič léčiv.

Práce využívá pro studium vlastností a fázových separací metodu rezonančního přenosu energie. Tato metoda je pokročilou fluorescenční technikou, která měří zhášení fluorescence donoru v přítomnosti akceptoru molekuly a používá se jako spektroskopické pravítko na vzdálenosti do deseti nanometrů. Umožňuje nám podívat se na vzorek blíže, než zvládá klasická optická mikroskopie. Technika rezonančního přenosu energie se využívá primárně pro zobrazování proteinů a protilátek, studium membránové dynamiky, tvorba proteinových komplexů, sekvencování DNA, detekce hybridizace nukleových kyselin a studium receptorových funkcí. Její využití pro studium koloidních systémů ještě není příliš rozšířené, proto prvním cílem této práce bylo zpracovat krátkou rešerši na využití RET pro tyto účely a pro studium gelů.

Jako další cíl práce bylo vybrat vhodné sondy pro studium koloidních systémů. Pro toto studium byly na základě vhodného překryvu spekter vybrány dva fluorescenční páry, hydrofobní donor s hydrofobním i hydrofilním akceptorem, a to perylen s fluoresceinem a DiO s perylenem. V první řadě pak byly studovány vlivy koncentrace akceptoru na intenzitu přenosu energie (míru jeho vázání na donor) stejně tak jako časové vlivy.

Posledním cílem bylo pak s využitím rezonančního přenosu energie a těchto vybraných fluorescenčních párů studovat fázové separace v různých hyaluronanových hydrogelech. Pomocí RET analýzy byly pak pozorovány převážně jednotlivé doby života donoru a donoru v přítomnosti akceptoru. Dále také byly pozorovány efektivita RET, parametr, který charakterizuje vzdálenost donoru a akceptoru, a pak intenzitu RET, charakteristiku vypovídající o procentuálním zastoupení donoru v přítomnosti akceptoru v gelech.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

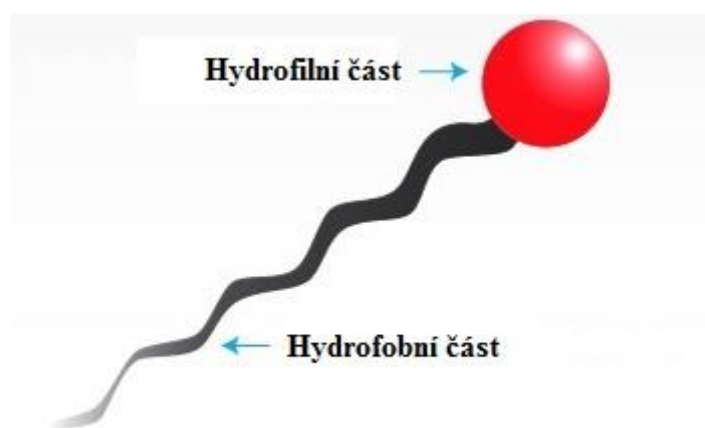
Tato část popisuje teoretické podklady pro tuto práci. Nejprve popisuje vlastnosti látek a systémů, tudíž tenzidů a gelů, konkrétněji septonexu a hyaluronanu, které jsou pro tuto práci použity jako modelové systémy. Dále pak popisuje metodu fluorescenční spektroskopie, pomocí které jsou tyto systémy studovány a to zhášení fluorescence a rezonanční přenos energie. Vyskytují se i volně v přírodě v biologických systémech, kde právě řeší například problémy s rozpustností. Jedním z takto hojně rozšířených tenzidů jsou například fosfolipidy, které jsou základní stavební složkou buněčných membrán.

### 2.1. Tenzidy

Povrchově aktivní organické látky, které snižují povrchové napětí, se nazývají tenzidy. Ty se hromadí na površích nebo fázových rozhraních. Cílem tohoto shlukování je snižování mezifázové energie soustavy. Při nasycení povrchové vrstvy mají tenzidy tendenci agregovat v roztoku a tvořit takzvané micely, kde opět dochází ke snižování volné energie systému.

#### 2.1.1. Struktura a vlastnosti tenzidů

Tenzidy jsou amfifilní, což znamená, že jejich struktura je bipolární. Obsahují tudíž nejméně dvě části, přičemž jedna je hydrofilní, polární a druhá hydrofobní, nepolární. Základní struktura tenzidu je zobrazena na obrázku 1.

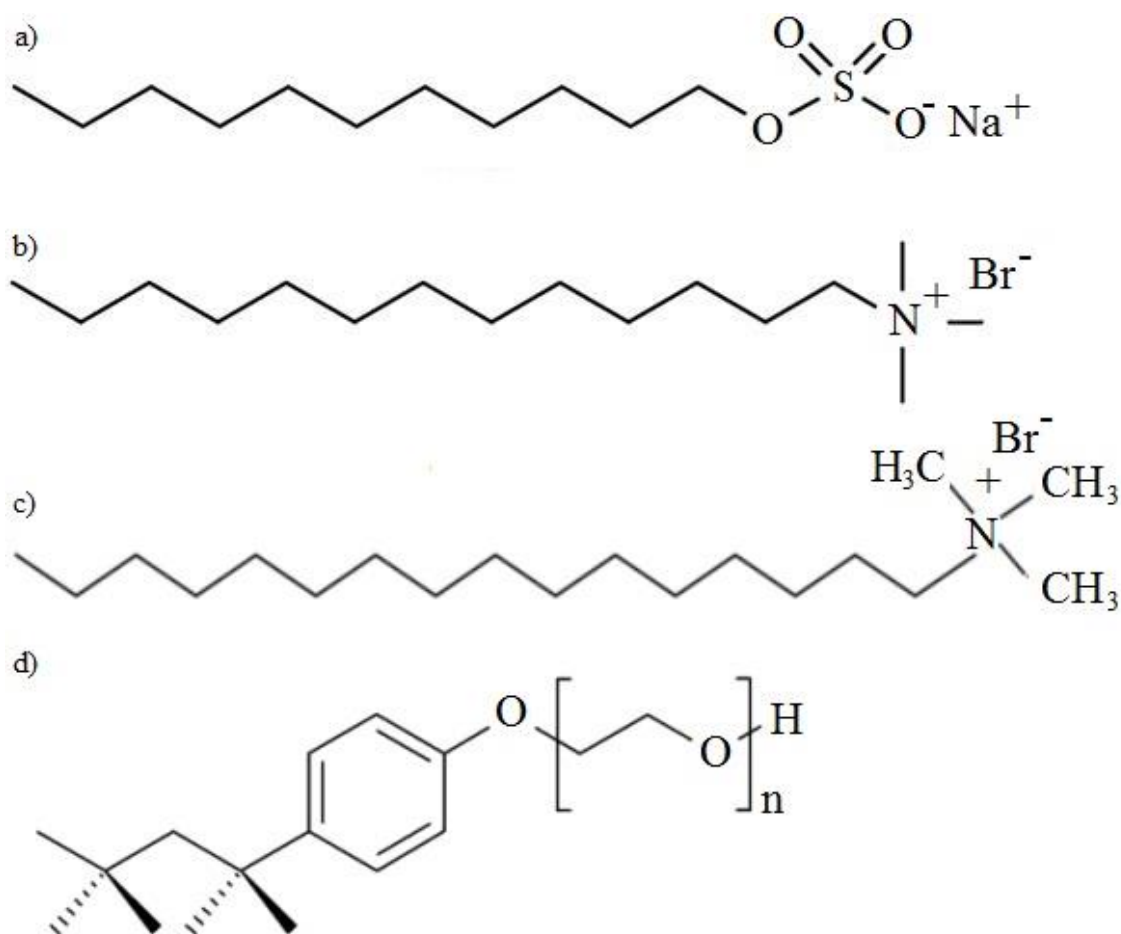


Obr. 1: Struktura tenzidu

Dělí se podle ionicity, tudíž podle náboje na polární hlavě, na anionické, kationické, amfoterní a neionické a často jejich výsledný charakter závisí na pH prostředí. V této práci se využívají tenzidy kationické, které jsou převážně založeny na dusíkovém atomu, který nese kladný náboj a tvoří kvartérní amoniové soli. Tyto tenzidy nelze kombinovat s anionickými, neboť se s nimi sráží. Mají mikrobicidní účinky. Používají se v pracích prostředcích či vlasové kosmetice. Dále se používají k povrchové úpravě různých materiálů díky tomu, že mají záporně nabitý povrch a kde slouží jako antistatické nebo antikoroziční činidlo.

Mezi ionogenní tenzidy patří například cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), tetradecyltrimethylamoniumbromid (TTAB), dodecylsulfát sodný (SDS) a karbethependeciniumbromid (Septonex) [1].

Neionogenní tenzidy jsou například 4-(1,1,3,3-Tetrametylbutyl)fenyl-polyetylene glykol (Triton X-100), polyoxyetylenamin (POEA), kokamid diethanolamin. Na obrázku 2 je znázorněna struktura některých výše uvedených tenzidů [2].



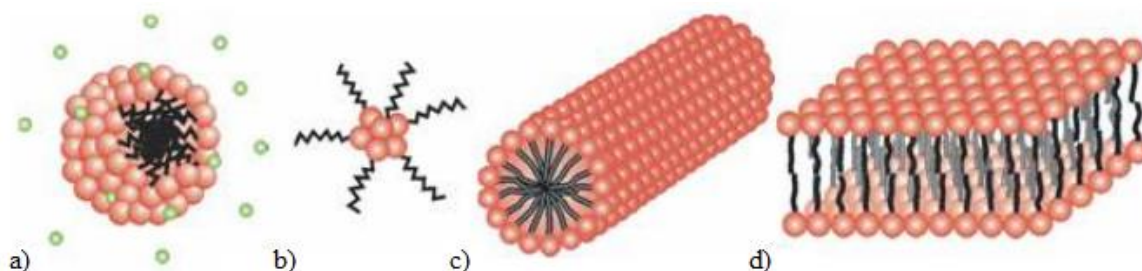
Obr. 2: Chemická struktura různých tenzidů: a) dodecylsulfát sodný, b) tetradecyltrimethylamoniumbromid, c) cetyltrimethylamoniumbromid, d) Triton X-100

### 2.1.2. Micely

Jak již bylo výše zmíněno, jednou z vlastností je i jejich agregace v roztoku po nasycení povrchové vrstvy ke snížení energie soustavy. Je to například v důsledku zrušení kontaktu hydrofobních domén s polárním rozpouštědlem. Výsledný charakter micel závisí na okolním prostředí. Micely se v roztoku začínají tvořit při dosažení takzvané kritické micelární koncentrace (CMC), jejíž velikost je převážně závislá na charakteru obou fází, struktuře tenzidu a teplotě.

Samotné micely jsou pak koloidní částice, které jsou při koncentraci tenzidu vyšší než CMC stabilní. Počet molekul tenzidu, které micelu tvoří, se nazývá agregační číslo. Micely se primárně rozlišují podle polaroty prostředí. Ve vodném polárním prostředí je povrch micel též polární a v organických rozpouštědlech tvoří inverzní micely s nepolárním povrchem. Micely dokážou rozpouštět látky v disperzním prostředí normálně nerozpustné. Nepolární látky se rozpouštějí v jejich nepolárních jádrech, polární u povrchu a bipolární se dokáží zabudovat do jejich obalu tak, aby polární část směřovala ven a nepolární do jádra [1].

S rostoucí koncentrací tenzidu může docházet ke změnám struktury micel. Mohou se tvořit klasické sférické micely, dále válcovité až laminární micely. Příklady různých typů micel jsou zobrazeny na obrázku 3.

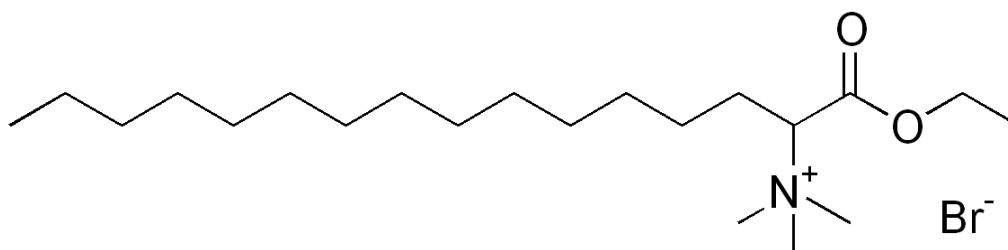


Obr. 3: Různé typy micel: a) sférická micela, b) inverzní micela, c) válcovitá micela, d) laminární micela [3]

### 2.1.3. Septonex

Tato práce v experimentální části využívá pro studium přenosu energie v modelových systémech tenzidu karbethopendeciniumbromid, zvaný též jako Septonex. Chemický název této sloučeniny je [1-(ethoxykarbonyl)pentadecyl]trimethylamoniumbromid a jeho struktura je zobrazena na obrázku 4. Je to bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek. Vodný roztok při třepání silně pění. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v chloroformu [4].

Tato látka patří mezi léčiva. Používá se jako účinná látka v různých antiseptických a dezinfekčních přípravcích, například Ophtalmo-Septonex nebo Mesocain a další.



Obr. 4: Struktura karbethopendeciniumbromidu

## 2.2. Gely

Gely jsou disperzní systémy, které tvoří trojrozměrnou makromolekulární síť. Tato síť vzniká, jestliže se mezi makromolekulami v polymerním roztoku vytvoří dostatečný počet spojů. Tyto spoje, jinak také uzly, mohou vzniknout dvěma hlavními způsoby. První způsob jejich tvorby je pomocí chemické reakce. V takovémto případě se pak jedná o kovalentně síťované gely. V této práci gely vznikají druhým způsobem a to pomocí působení fyzikálních sil (polární síly, vodíkové vazby, Van der Waalsovy síly). Tyto gely se nazývají fyzikálně síťované. Částice tvořící strukturu hydrogelu bývají koloidní velikosti.

Disperzní prostředí gelů je tvořeno rozpouštědlem. Pokud je toto rozpouštědlo organického charakteru, jedná se o organogely. V druhém případě je rozpouštědlo voda a pak se jedná o hydrogely. Pokud dojde k odstranění rozpouštědla, vzniká pak xerogel. Pokud tento xerogel je možná přidáním rozpouštědla vrátit do původního stavu, jedná se o reverzibilní, elastické gely. Tomuto procesu se říká botnání. V opačném případě se jedná o gely ireverzibilní,

neelastické, které sice jsou schopny část kapaliny adsorbovat, ale do původního stavu se nevracejí [5].

### **2.2.1. Vlastnosti a vznik gelů**

I přes to, že gely mají kapalně prostředí, tak mají mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav. Jsou schopny odolávat určitému napětí do hodnoty, kde se dále chovají jako elastické těleso. Elasticita je převážně dána počtem vazeb v jednotce objemu. Čím je jich více, tím je gel rigidnější. U fyzikálně síťovaných gelů může docházet k jevu zvanému tixotropie. Jedná se o jev, kdy po působení vnější síly dojde k rozrušení vazeb ve struktuře a z gelu se stává polymerní roztok. Pokud roztok necháme v klidu, dojde opět k vytvoření gelu. Pokud gel obsahuje rozpuštěné nízkomolekulární látky, tak gel si zachovává stejnou elektrickou vodivost jako původní sol. Pro tyto nízkomolekulární látky je difuze v prostředí gelu jen velmi málo snížena, než v solu, i přes vysoký nárůst viskozity.

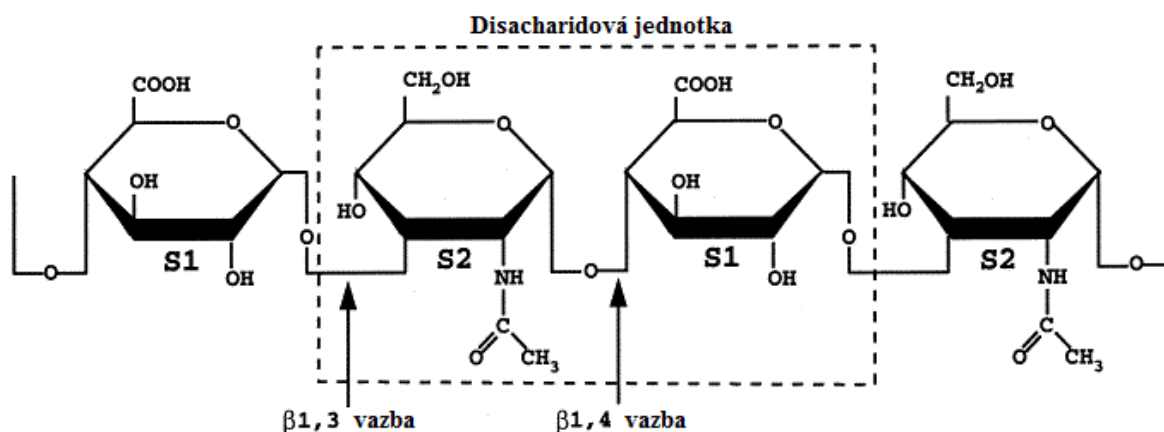
Gely vznikají pomocí chemického nebo fyzikálního zesíťování polymerních jednotek v uzlech. Tento proces se nazývá gelace. V této práci jsou studovány fyzikálně síťované hydrogely [6].

### **2.2.2. Hydrogely**

Hydrogely jsou hydrofilní polymerní síť, kde místo mezi makromolekulami vyplňuje voda. Jsou schopné pojmout hmotnostně desetiny až tisícinásobky vody k jejich váze jako xerogelu. Obvykle nebývají homogenní a obsahují oblasti, kde je hustota vazeb hustší. Těmto místům se říká klastry. V našem případě vazby tvoří převážně iontovými interakcemi mezi záporně nabitými polymerními jednotkami hyaluronanu a kladně nabitými jednotkami tenzidu. Přirozeně se vyskytují jako želatina, nebo kolagen. Díky svým vlastnostem a převážně skvělé biokompatibilitě mohou mít velice široké využití v biomedicínských aplikacích. Jsou využívány například pro léčivé obvazy, oftalmologické materiály pro kontaktní čočky, nosiče v tkáňovém inženýrství, neboli skafoldy, nosiče léčiv, membrány nebo implantáty [7,8].

## **2.3. Hyaluronan**

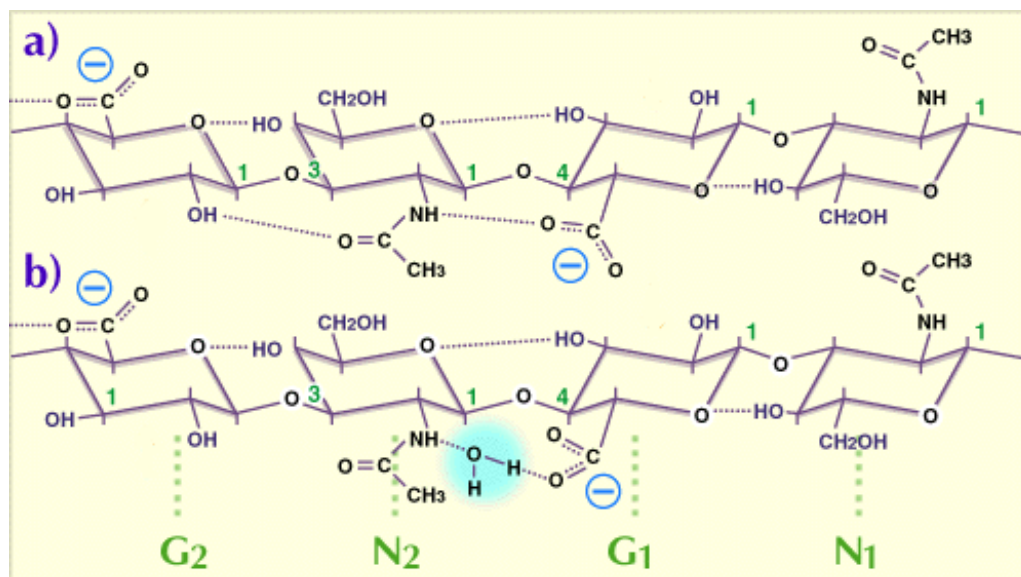
Hyaluronan je vysokomolekulární glykosaminoglykan, který se přirozeně vyskytuje u všech savců. Skládá se z opakujících se disacharidových jednotek  $\beta$ -1-4 vázané D-glukuronové kyseliny a  $\beta$ -1-3 vázaného N-acetyl-D-glukosaminu. Struktura je znázorněna na obrázku 5. Molekula hyaluronanu se může skládat až z deseti tisíce disacharidových jednotek, tudíž jedna molekula může mít váhu až okolo čtyřech milionů daltonů a délku až deset mikrometrů. Díky jeho vysoké molekulové hmotnosti tvoří vysoce viskózní roztoky již při nízkých koncentracích. Hyaluronan se nachází v extracelulární matrix buněk. U člověka se vyskytuje v měkkých pojivových tkáních, jako jsou kůže, pupeční šňůra, synoviální tekutina nebo sklivce v oku [9].



Obr. 5: Základní chemická struktura hyaluronanu.

### 2.3.1. Historie a struktura

Hyaluronan byl objeven a pojmenován poprvé v roce 1934 Karlem Mayerem, který ho úspěšně izoloval ze sklivce oka. Nazval ho kyselina hyaluronová, ale protože se vyskytuje v těle v podobě soli, říká se jí hyaluronan. Teprve o dvacet let později dokončil konečné určení jeho chemické struktury a ukázal, že se skládá z opakujících se disacharidových jednotek. Dále pak byl hyaluronan extrahován primárně ze synoviální tekutiny, kohoutích hřebínků a pupečních šňůr. Tato extrakce se ale potýkala s problémy, protože izoláty vždy obsahovaly nějaké proteiny. Tyto problémy a kontroverze jsou dnes již překonány a hyaluronan se získává extrakcí z buněčných stěn fermentovaných bakterií.



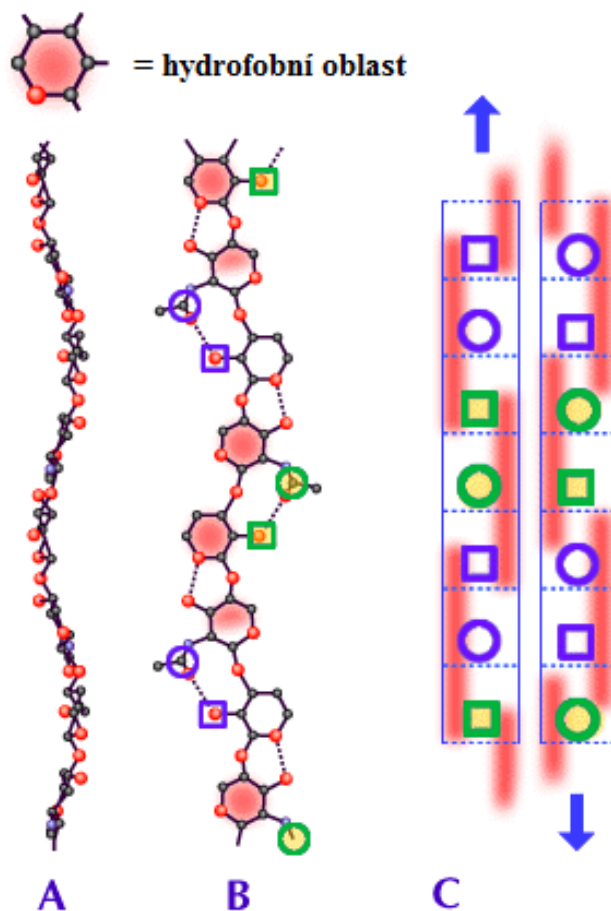
Obr. 6: Chemická struktura tetrasacharidové jednotky ukazující preferovanou konfiguraci ve vodě. V bezvodém prostředí (a) a ve vodě (b) je znázorněný rozdíl, kdy v bezvodém prostředí je vodný můstek nahrazený vodíkovým můstkem mezi acetoamidem N2 a karboxylátem G1. [10]

Primární struktura hyaluronanu je tvořena disacharidovými jednotkami. Ty jsou spojené  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 glykosidickými vazbami. Řetězec hyaluronanu obsahuje dva typy vazeb. První jsou vazby v sacharidových kruzích, které je udržují relativně v pevném tvaru. Druhé jsou

glykosidické vazby mezi těmito rigidními jednotkami, které obsahují jeden atom kyslíku. Dvě vazby, které kyslík obsahuje, tvoří písmeno V a substituenty na těchto vazbách mohou rotovat v  $360^\circ$ , ačkoliv výpočty a modelace ukázaly, že mohou zaujímat pouze několik možných konfigurací. Při vynásobení počtu vazeb v molekule a těchto několika konfigurací dostáváme opravdu velké množství možných tvarů molekuly, které může zaujímat. Uspořádání v molekule ovšem náhodné není. Navíc v každé tetrasacharidové jednotce je potencionálně až pět vodíkových můstků, které stabilizují vazby mezi sousedícími sacharidovými jednotkami, jak je vidět na obrázku 6.

Sekundární struktura je tvořena dvounásobným řetězcem (nikoliv dvoušroubovicí), při jehož stabilizaci hraje klíčovou roli voda. Tato struktura obsahuje rozsáhlou hydrofobní oblast o velikosti osmi uhlíkových atomů. Hyaluronan má vysoce hydrofilní vlastnosti a zároveň obsahuje tyto hydrofobní oblasti, díky čemuž je tedy amfifilní.

Hyaluronan agreguje i sám se sebou částečně díky interakcím mezi hydrofobními oblastmi a tím vytváří terciální strukturu, znázorněnou na obrázku 7. Ony dvojnásobné řetězce díky těmto jsou antiparalelní. Jsou identické a mohou růst oběma směry. Na těchto řetězcích je mnoho negativně nabitých skupin, které způsobují elektrostatickou repulzi, ta je ovšem vyvážena hydrofobními interakcemi a zároveň vodíkovými můstky. Výsledné vazby, které tyto struktury drží pohromadě, jsou ovšem poměrně slabé a tak tyto struktury vznikají a disociují v závislosti na podmínkách, primárně na koncentraci a teplotě [10].

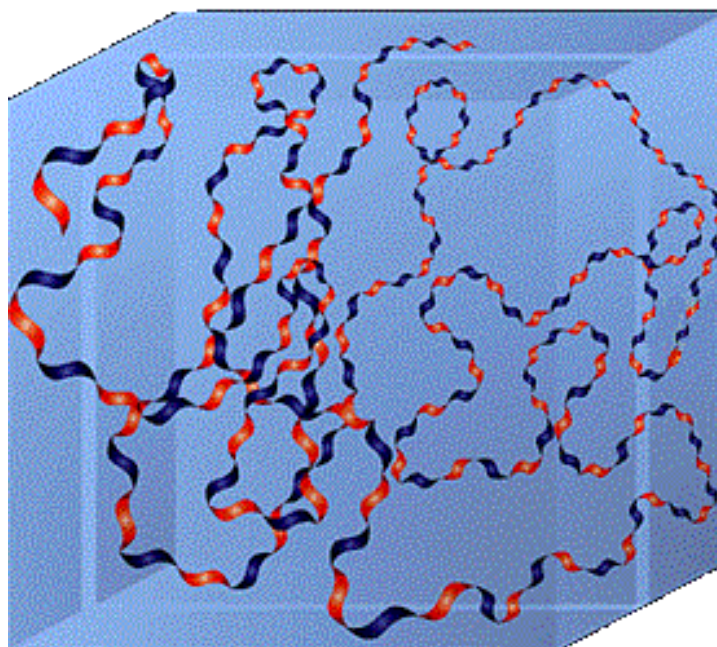


Obr. 7: Obrázek A a B znázorňují molekulu hyaluronanu. Hydrofobní oblasti jsou značeny červeně. Čtverce znázorňují karboxylové a kruhy acetamidové skupiny. Na obrázku C je příklad dvounásobného antiparalelního řetězce hyaluronanu.[10]



### 2.3.2. Tvorba polymerních roztoků

V roztoku je řetězec molekuly hyaluronanu zpevněn kombinací chemické struktury a vazeb disacharidových jednotek, vnitřními vodíkovými interakcemi a interakcemi s rozpouštědlem. U hyaluronanu dochází k poměrně širokému náhodnému rozvinutí struktury ve fyziologických roztocích. Obsah hyaluronanu v jedné doméně se pohybuje přibližně kolem 0,1% hmotnostní koncentrace ve velmi zředěných roztocích. U hyaluronanového řetězce axiálně orientované atomy vodíku tvoří relativně hydrofobní domény a ekvatoriální boční řetězce zase hydrofilní domény. Vytváří se tedy pásková struktura, která je znázorněna na obrázku 8. Tato doménová struktura má velmi důležité důsledky na malé molekuly v roztoku. Voda, elektrolyty i živiny mohou volně touto strukturou difundovat. Naopak velké molekuly, jako proteiny, jsou částečně z této struktury vylučovány. Řetězce hyaluronanu se bez ustání pohybují a tudíž se také pořád mění efektivní velikost póru. Proto čím je molekula větší, tím je difuze skrz roztok pomalejší [11].



Obr. 8: Model páskové struktury hyaluronanu v třídimenzionální doméně. [11]

### 2.3.3. Metabolismus hyaluronanu a jeho využití

Metabolismus hyaluronanu je velice dynamický. Některé buňky, jako chondrocyty v chrupavce, zároveň syntetizují i katabolizují hyaluronan a to tak, že výsledná koncentrace zůstává konstantní. V některých buňkách pak převládá syntéza nebo naopak degradace. Podle lokace v těle se i liší jeho koncentrace. Zatímco v pupeční šňůře je jeho koncentrace čtyři gramy na litr, tak v dermis je koncentrace dvě desetiny gramu na litr. Celkově se v lidském těle nachází přibližně patnáct gramů hyaluronanu na sedmdesát kilogramů tělesné váhy. Zároveň podle místa jsou i různé doby života hyaluronanu. V kůži a chrupavce je poločas rozpadu v řádů dní až pár týdnů, zatímco v krvi je poločas rozpadu pouhých pár minut. V pojivcích dochází k uvolňování hyaluronanu do synoviální tekutiny, kde se stává hlavní součástí, která zajišťuje její viskoelastické vlastnosti. Dále dochází k úniku u molekul z extracelulární matrix z tkání a to do lymfatického systému společně pak i se synoviální

tekutinou. V něm dochází k hlavní degradaci hyaluronanu, než vstoupí do krevního řečiště. Od tam je finálně zpracován z velké části v játrech a v menším přispívají i ledviny [11,12].

## 2.4. UV-VIS spektrometrie

Tato fyzikálně-chemická metoda měří absorpci elektromagnetického záření v oblasti UV (180-380 nm) a viditelného světla (380-780 nm). Díky jednoduchosti, přesnosti a rychlosti tato je tato metoda velice oblíbená. Při absorpci elektromagnetického záření dochází k excitaci elektronů, tudíž tyto elektory zaujímají vyšší energetické hladiny, než je jejich základní stav. Veličina charakterizující pravděpodobnost tohoto přechodu se nazývá molární absorpční (extinkční) koeficient  $\varepsilon$ . Tato veličina je závislá na struktuře a průřezu absorbující molekuly, nikoliv na její koncentraci. Množství absorbovaného záření závisí na počtu molekul, které interagují s elektromagnetickým zářením, tudíž i na tloušťce prostředí  $l$ , kterým prochází. Veličina, která vyjadřuje množství absorbovaného záření, se nazývá absorbance. Vztah, který linearizuje vztah mezi absorbancí  $A$  a koncentrací  $c$  se nazývá Lambert-Beerův zákon a je definován takto:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

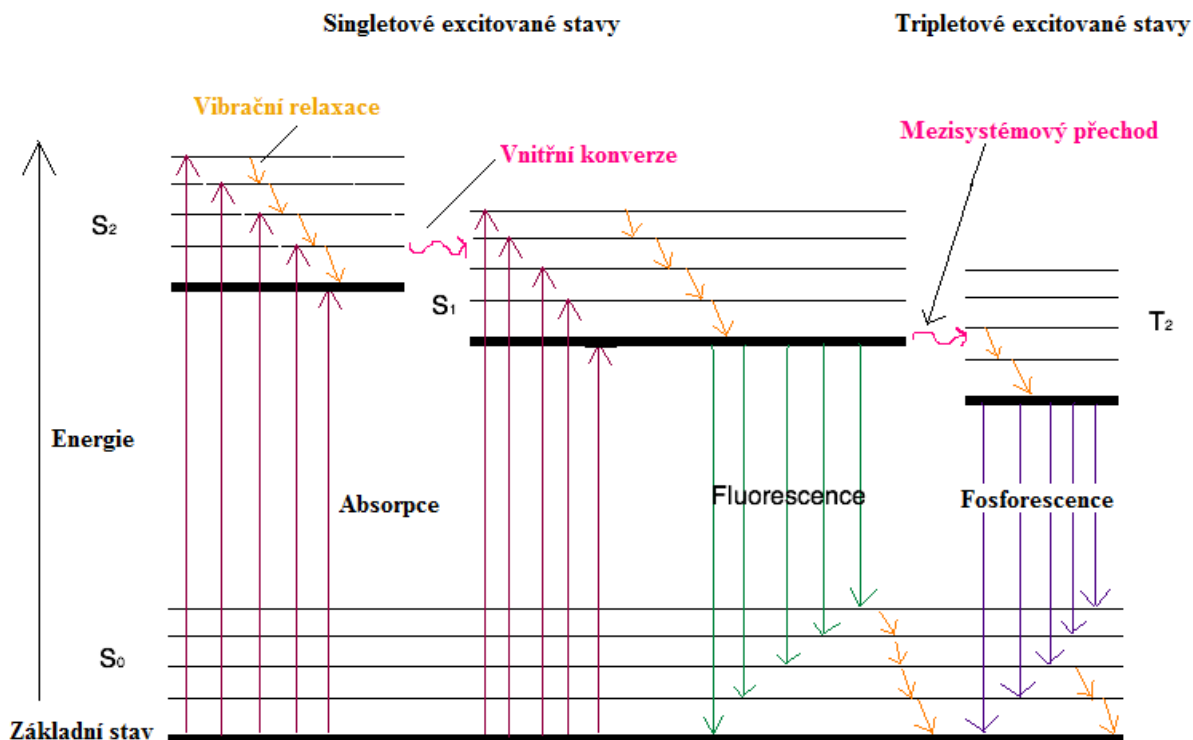
Díky jeho jednoduchosti lze se znalostí molárního extinkčního koeficientu rychle a přesně určit koncentraci měřeného vzorku. [13]

## 2.5. Fluorescenční spektroskopie

Při excitaci látky elektromagnetickým zářením dochází k fotoluminiscenci. Tento jev je provázen zářivými a nezářivými přechody, které probíhají při deexcitaci a jsou znázorňovány pomocí Jablonského diagramu (obr. 9).

Nejdříve dochází absorpci elektromagnetického záření, což trvá přibližně  $10^{-15}$  sekundy. Při ní se elektron excituje fotonem ze základního stavu do vyšší energetické hladiny. Vlnové délky záření, které mohou excitovat elektrony, závisí na struktuře dané molekuly. Všechny stavy, ať už singletový  $S_1$ ,  $S_2$  nebo tripletový  $T_1$ ,  $T_2$ , mají více vibračně rotačních energetických hladin. V Jablonského diagramu jich je znázorněno pouze pár, protože jich ve skutečnosti je velké množství. Po excitaci elektronu postupně pomocí nezářivého procesu, vibrační relaxací, přechází na nižší vibrační hladiny. V momentě, kdy elektron dosáhne energetické hladiny se shodnou energií hladiny jiného stavu, dochází k dalšímu nezářivému procesu zvanému vnitřní konverze, jako například přechod elektronu ze stavu  $S_2$  do stavu  $S_1$  na shodnou energetickou hladinu. Elektron ve stavu  $S_1$  přechází vibrační relaxací na nižší energetické hladiny a pak dochází buď k prvnímu zářivému přechodu, fluorescenci, nebo k nezářivému mezisystémovému přechodu, který má o několik řádů delší dobu trvání, než fluorescence. Tento přechod patří mezi zakázané přechody. Elektron přechází ze singletového do tripletového a dochází ke změně spinu. Zde pak může dojít k druhému zářivému procesu, fosforescenci, což je další zakázaný přechod, kdy dochází k deexcitaci elektronu z tripletového do singletového  $S_0$  stavu [14].





Obr. 9: Jabloňského diagram znázorňující energetické přechody při fotoluminiscenci.

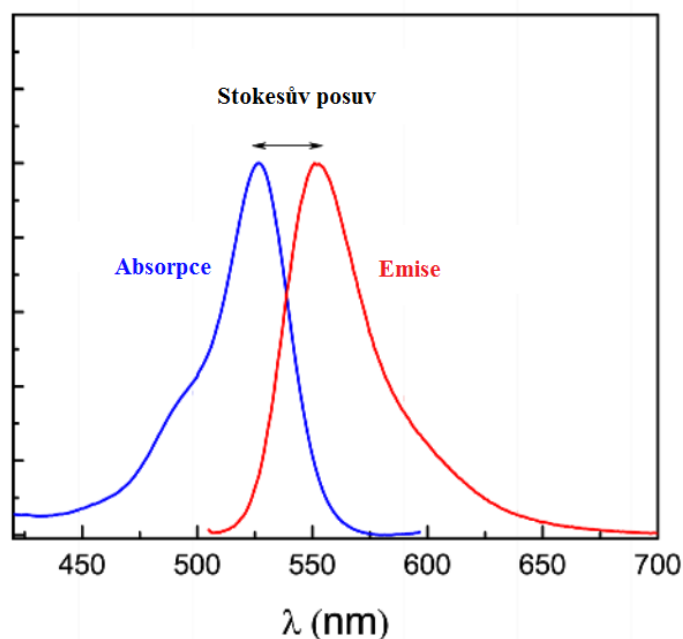
### 2.5.1. Fluorescence

Jak uvádí předchozí kapitola, elektronu se po excitaci energie zbavuje několika možnými způsoby. Jedním z nich je fluorescence. To je jev, při kterém dochází u deexcitace elektronu ze singletového stavu na energetickou hladinu základního  $S_0$  stavu k emisi fotonu.

Vyzářený foton má menší energii, než byla původní absorbovaná energie. Část se ztrácí při nezářivých přechodech, jako jsou vibrační relaxace a vnitřní konverze. Díky této ztrátě pak dochází k posuvu emisního fluorescenčního spektra oproti absorpčnímu k vyšším vlnovým délkám, které jsou spojeny s nižší energií. Tento posuv spekter se nazývá Stokesův posuv (obr. 10). Absorpční a emisní spektra jsou u velkého množství organických molekul téměř zrcadlově symetrická.

Fluoreskující látky nazýváme fluorofory nebo fluorescenční barviva. Intenzivní fluorescenci vykazují převážně některé polyaromatické a heterocyklické uhlovodíky, například fluorescein, nebo rhodamin B. Mezi fluorofory patří i velké množství přírodních látek, jako jsou některé aminokyseliny, alkaloidy nebo nukleové kyseliny.

Fluorescenční kvantový výtěžek neboli poměr množství záření, které bylo emitováno a absorbováno za jednotku času, může být snížen takzvaným zhášením fluorescence. To může probíhat několika způsoby. Dynamické zhášení nastává, pokud se fluorofor srazí s molekulou zhášeče. Ke statickému zhášení dochází, pokud fluorofor vytvoří se zhášečem již nefluoreskující komplex. Samozhášení je pak proces, ke kterému dochází při vysoké koncentraci fluoreskující molekuly. [15]



Obr. 10: Stokesův posuv

### 2.5.2. Fluorescenční sondy

Vzhledem k silnému působení okolí na fluorescenci látek se fluoreskující molekuly neboli fluorescenční sondy používají ke studiu fyzikálních, strukturních nebo chemických vlastností studovaného prostředí, případně jeho vizualizaci. Studují se pomocí nich jak chemické tak i biologické systémy. Sondy lze rozdělit primárně na vnější nebo vnitřní a na kovalentně a nekovalentně vázané. Vnitřní sondy se vyskytují přirozeně, jako například aromatické aminokyseliny, NADH a chlorofyl. Vnější sondy, jako fluorescein nebo rhodamin jsou do systému přidávány. Vzhledem ke složitosti syntéz molekul nebo makromolekul s kovalentně vázanými sondami se využívají sondy nekovalentně vázané. V takovém případě je pak esenciální charakter sondy, který bývá buď hydrofobní, hydrofilní nebo amfifilní. Podle toho se mohou rozpouštět v oblastech systému, které mají být studovány.

Výběr sondy je závislý na jejích chemických a strukturních vlastnostech a její senzitivitě vůči studovanému prostředí (pH, polarita a další). [16,17]

### 2.5.3. Kvantový výtěžek a doba života fluorescence

Doba života a kvantový výtěžek fluorescence jsou pravděpodobně ty nejdůležitější dvě charakteristiky každého fluoroforu. Kvantový výtěžek je definován jako kvantum emitovaných fotonů ke kvantu absorbovaných fotonů. Látky s nejvyšším kvantovým výtěžkem mají nejzářivější emisi. Doba života nám říká, jak průměrně dlouho molekula zůstává v excitovaném stavu, než dojde k vyzáření fotonu a navrácení zpět do základního stavu. Doba života nezávisí na koncentraci, absorpci vzorkem, tloušťce vzorku nebo intenzitě excitace. Je primárně závislá na vlastnostech prostředí.

Tyto dvě charakteristiky mohou být znázorněny pomocí zjednodušeného Jablonského diagramu (obr. 11), který znázorňuje primárně proces deexcitace do základního stavu. Tento proces je řízen primárně dvěma rychlostními konstantami  $k_{nr}$  pro nezářivý přechod a  $\Gamma$  pro zářivý přechod. Kvantový výtěžek je pak definován jako:

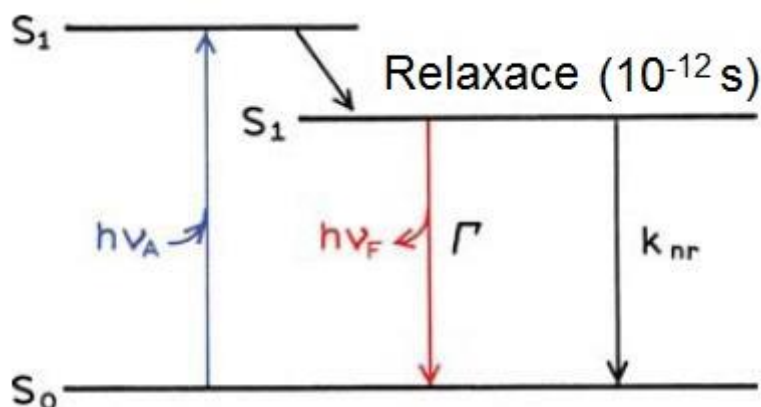
$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Pokud je  $k_{nr}$  téměř nulová, tak kvantový výtěžek se blíží jedné. Ten je ovšem díky Stokesovým ztrátám neboli nezářivým přechodům vždy nižší, než jedna.

Doba života je čas molekuly strávený v excitovaném stavu, než se vrátí zpět do základního  $S_0$  stavu. Obecně bývá v řádu několika až kolem deseti nanosekund. Pro fluorofor zobrazený na obrázku 11 je doba života:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3)$$

Nutno připomenout, že doba života je průměrnou dobou molekul v excitovaném stavu.



Obr. 11: Zjednodušený Jablonského diagram. [17]

Doba života, která neobsahuje nezářivý rozklad, se nazývá přirozená doba života:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (4)$$

V podstatě může být vypočítána pomocí absorpčního spektra, emisního spektra a extinkčního koeficientu fluoroforu. Může být také vypočítán pomocí měřené doby života a kvantového výtěžku:

$$\tau_n = \frac{\tau}{Q} \quad (5)$$

Mnoho biochemický fluoroforů se ovšem nechová tak předvídatelně, jako nesubstituované aromatické sloučeniny. Proto pak dochází k rozporu mezi výpočtem z rovnice 5 a z absorpčního a emisního spektra. Jedním z důvodů je například, že některé molekuly fluoroforu se mohou nacházet poblíž zhášecích skupin. [18]

## 2.5.4. Zhášení fluorescence

Intenzita fluorescence může být za pomoci několika různých mechanismů zeslabena, jinak řečeno zhášena. Ve většině případů se jedná o bimolekulární proces.

Existuje několik fotofyzikálních procesů, které způsobují deexcitaci molekuly. Může se jednat o srážku s nějakým těžkým atomem nebo paramagnetickou molekulou jako kyslík, přenos elektronu, protonu nebo energie na akceptorní molekulu, tvorba excimeru nebo tvorba exciplexu. Zhášení fluorescence nám může poskytovat jak kvantitativní, tak kvalitativní informace o prostředí.

Při zhášení může dojít k několika případům. U prvního je zhášec ve velkém nadbytku oproti excitované molekule, tudíž je vysoká pravděpodobnost interakce. Pokud je pravděpodobnost, že se excitovaná molekula a zhášec potkají, menší než 1, situace odpovídá statickému zhášení. Pokud se pravděpodobnost rovná 1, jedná se o reakci pseudoprvního řádu, při které je akceptor vždy poblíž.

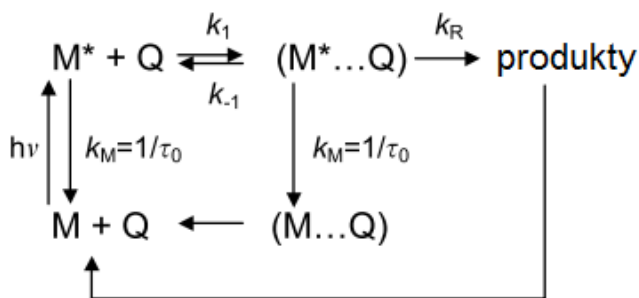
U druhého případu zhášec není ve velkém nadbytku a přiblížení excitované molekuly a zhášedla není možné během doby života fluoroforu. To může být způsobeno například vysokou viskozitou média nebo příliš krátké doby života. Zhášení pak může probíhat pouze na větší vzdálenosti, než je kolizní vzdálenost. Jedná se o nezářivé přenosy energie na vzdálenost až 80 Å.

Třetí případ nastává (obr. 12), když zhášec není ve velkém nadbytku, ale s excitovanou molekulou se může potkat. Tento proces je pak kontrolován difuzí a nazývá se dynamické zhášení. Při vyšších koncentracích zhášedla pak může docházet zároveň i ke statickému zhášení.

Pokud fluorofor reaguje s excitovanou molekulou, tvoří se takzvaný excimer  $(MM)^*$ , který má své vlastní fluorescenční spektrum a dobu života a jestliže je M stejné jako Q, nedochází k tvorbě produktů a jedná se o samozhášení.

Při reakcích kontrolovaných difuzí je rychlostní konstanta zhášení závislá na čase. Excitované fluorofory, které se nacházejí při době excitace v krátké vzdálenosti od zhášedla průměrně reagují kratší dobu, než ty, které jsou od zhášedla vzdáleny, protože jejich vzájemné přiblížení pak vyžaduje delší dobu. Tohle pak ovlivňuje začátky měřených křivek poklesu fluorescence. Znatelné je to hlavně při vyšší viskozitě roztoku nebo vyšší koncentraci zhášedla. [17,18]

Při tvorbě produktů u rychlostní konstanty  $k_R$  rozlišujeme tři případy:



Obr. 12: Dynamické zhášení,  $k_1$  je rychlostní konstanta difuzní reakce druhého řádu,  $k_{-1}$  rychlostní konstanta zpětné reakce 1. řádu,  $k_M$  rychlostní konstanta vnitřní deexcitace a  $k_R$  rychlostní konstanta 1. řádu tvorby produktů. [18]

1.  $k_R > k_1[Q]$ ,  $k_{-1}$ ,  $1/\tau_0$ : reakce

je difuzně omezená, pozorovaná zhášecí rychlostní konstanta  $k_q$  je shodná s difuzní rychlostní konstantou  $k_1$ .

2.  $k_R < k_1[Q]$ ,  $k_{-1} > 1/\tau_0$ : rovnováhy je dosaženo především tvorbou produktů

3.  $k_R$  je stejného řádu nebo menší, než ostatní rychlostní konstanty:  $k_q$  je menší jak  $k_1$ , tudíž se může zapsat jako:

$$k_q = pk_1 \quad (6)$$

kde  $p$  je pravděpodobnost reakce dvojice  $M^*$  a  $Q$ , jinak zvané jako efektivita, která může být vyjádřena jako funkce rychlostních konstant. [18]

Zhášení fluorescence bylo poslední dobou velice využívané při studiu micel. Fluorescenční sondy se solubilizují v jádrech micel, což pak následně poskytuje informace o strukturních a dynamických vlastnostech micelárních systémů. [19]

#### 2.5.4.1. *Dynamické zhášení, Stern-Volmerův vztah*

Dynamické neboli kolizní zhášení nastává, když se  $M^*$  a  $Q$  setkávají a dochází k deexcitaci  $M^*$  do základního stavu. Při této reakci nedochází k chemickým změnám molekul. Pokles intenzity fluorescence je při kolizním zhášení popsán velice známou Stern-Volmerovou rovnicí:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (7)$$

kde  $I_0$  a  $I$  jsou intenzity fluorescence v přítomnosti a s absencí zhášeče.  $K_{sv}$  je Stern-Volmerova konstanta. Obecně je poměr  $I_0$  a  $I$  vynášen v závislosti na koncentraci zhášeče (Stern-Volmerova závislost), kde v případě lineární závislosti je Stern-Volmerova konstanta  $K_{sv}$  směrnice přímky. V případě, že známe dobu života  $M^*$  bez přítomnosti  $Q$ , můžeme spočítat rychlostní konstantu  $k_q$ . Mohou nastat dva případy, kdy u prvního není bimolekulární proces omezen difuzí a pak  $k_q = p \cdot k_1$ , kde  $p$  je účinnost reakce a  $k_1$  rychlostní konstanta difuze a u druhého případu je tento proces difuzí omezen a pak se  $k_q$  rovná  $k_1$  a může být zapsána pomocí zjednodušeného Smoluchowskiho vztahu:

$$k_1 = 4\pi NR_C D \left( \text{L.mol}^{-1}\text{s}^{-1} \right) \quad (8)$$

kde  $R_C$  je vzdálenost nejbližšího přiblížení v centimetrech,  $D$  je vzájemný difuzní koeficient a  $N$  je jedna tisícina Avogadrovy konstanty  $N_A$  vzhledem k nutnosti převodu jednotek. Společný difuzní koeficient je součtem jednotlivých koeficientů pro  $M$  a  $Q$ , tudíž je vyjádřen pomocí Stokes-Einsteinova vztahu:

$$D = D_M + D_Q = \frac{kT}{f\pi\eta} \left( \frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_Q} \right) \quad (9)$$

kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $\eta$  je viskozita prostředí a  $f$  je koeficient, který je roven 6 pro kulovité a 4 pro ploché rozhraní.  $R_M$  a  $R_Q$  jsou poloměry molekul  $M$  a  $Q$ .

Ve skutečnosti je difuzní koeficient ovšem časově závislý a dochází k takzvaným přechodným jevům. V prostředích s nízkou viskozitou, blíží se vodě, jsou tyto jevy znatelné

pouze při velmi malých časech ( $<10^{-14}$  pikosekund) a efekt může být zanedbán. V případě viskózních médií už tento jev nemůže být ignorován. Dochází pak ke změně křivky fluorescenčního poklesu a již není monoexponenciální.

Dynamické zhášení je rovněž ovlivňováno teplotou. Vzhledem k tomu, že u dynamického zhášení hraje hlavní roli difuze, tak při vyšších teplotách dochází ke zvýšení difuzních koeficientů, tudíž vyšší teploty toto zhášení podporují. Naopak u statického zhášení vyšší teploty způsobují menší stabilitu komplexů mezi M a Q, tudíž v tomto případě ho zeslabují. [18]

#### 2.5.4.2. Statické zhášení

V předchozí kapitole bylo vysvětleno zhášení jakožto výsledek srážky excitované molekuly a zhášedla. Zhášení může být způsobováno i tvorbou nefluoreskujících komplexů v základním energetickém stavu mezi M a Q, nebo existencí určité sféry efektivního zhášení kolem molekuly fluoroforu. V takovém případě se pak jedná o statické zhášení (obr. 13). V momentě, kdy komplex absorbuje záření, dochází k okamžitému návratu do základního stavu bez emise fotonu.

V prvním případě, kdy se jedná o existenci sféry efektivního zhášení,  $M^*$  a Q nemohou změnit jejich vzájemnou pozici během doby života  $M^*$ . Může se tak dít v důsledku například vysoce viskózního média. To předpokládá Perinnův model, kdy zhášení je úplné, pokud se Q nachází právě v této efektivní sféře zhášení molekuly M. V případě, že se Q nenachází v této sféře, nemá žádný vliv na M, proto intenzita fluorescence klesá s koncentrací Q, ale doba života se nemění. Perinnův model vede k malé úpravě Stern-Volmerovy rovnice:

$$\frac{I_0}{I} = \exp(V_q N_A [Q]) \quad (10)$$

kde  $V_q$  je objem efektivní sféry zhášení fluoroforu M. V porovnání s klasickou Stern-Volmerovou rovnicí není poměr  $I_0$  a  $I$  lineárně závislý primárně u vyšších koncentrací. U nízkých koncentrací je závislost téměř lineární a proto vztah můžeme vyjádřit jako:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + V_q N_A [Q] \quad (11)$$

Vynesením poměru intenzit fluorescence  $I_0$  a  $I$  oproti koncentraci zhášedla Q získáme hodnotu  $V_q$ , která se obvykle pohybuje mezi  $1-3 \text{ l.mol}^{-1}$ . To odpovídá poloměru sféry přibližně okolo  $10 \text{ Å}$ , což je o něco víc, než dosah Van der Waalových sil.

V druhém případě dochází k tvorbě nefluoreskujících komplexů, které se nacházejí v základním energetickém stavu. Doba života fluoroforů, které komplex nevytvoří, zůstává nezměněná a intenzita opět klesá s přidávkem zhášedla. Pokud vyjádříme stabilitu systému pomocí rovnovážné konstanty  $K_S$ :

$$K_S = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad (12)$$

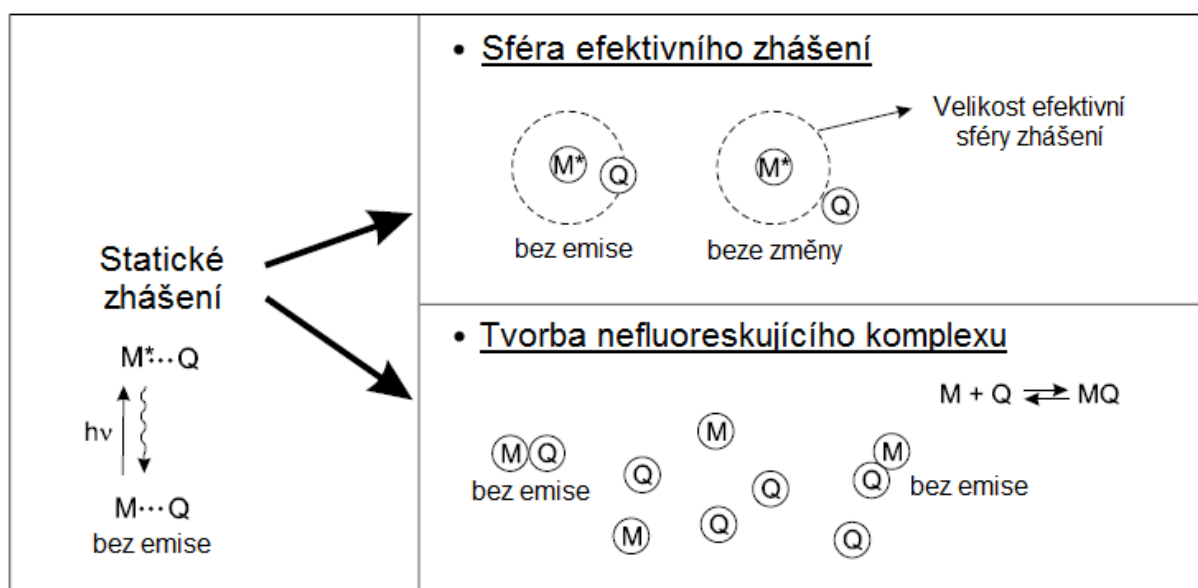
a pokud použijeme zákon zachování hmotnosti:

$$M_0 = [M] + [MQ] \quad (13)$$

kde  $M_0$  je celková koncentrace M, dostáváme po úpravě vztah podobný Stern-Volmerově rovnici:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s [Q] \quad (14)$$

a opět dostáváme lineární závislost poměru  $I_0$  a  $I$  ke koncentraci zhášedce, kde nutno připomenout, že nedochází k změně doby života jako u dynamického zhášení, tudíž tento poměr je srovnatelný s poměrem dob života  $\tau_0$  a  $\tau$ . [18]



Obr. 13: Znáznornění obou mechanismů statického zhášení.[18]

#### 2.5.4.3. Kombinované statické a dynamické zhášení

V mnoha případech může docházet zároveň ke koliznímu zhášení tvorbě nefluoreskujících komplexů. V takovém případě dochází k porušení linearitu Stern-Volmerovy závislosti a při vyšších koncentracích Q dochází vychylování křivky směrem k ose y. Pokud bysme tedy uvažovali tvorbu nefluoreskujících komplexů a zároveň kolizní zhášení, můžeme pak poměr  $I_0$  a  $I$  napsat jako:

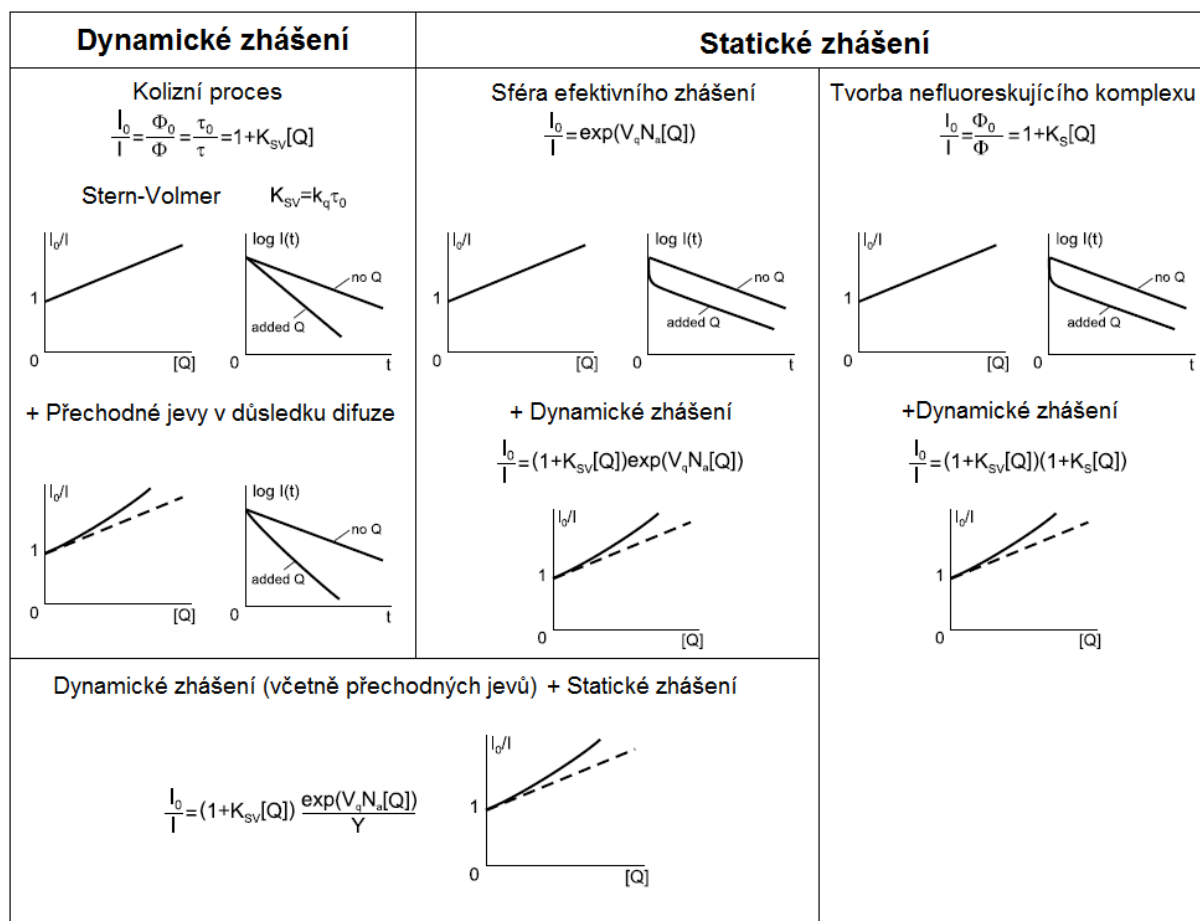
$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{sv} [Q])(1 + K_s [Q]) \quad (15)$$

$K_{sv}$  a  $K_s$  mohou být pak určeny například tak, že se vynese závislost  $(I_0/I - 1)/[Q]$  proti  $[Q]$ , která by už měla být lineární.

Pokud bychom vzali v úvahu model efektivních sfér zhášení, dostaneme následující vztah:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{sv} [Q]) \exp(V_q N_A [Q]) \quad (16)$$

Rozdíly mezi dynamickým a statickým zhášením pro různé případy jsou znázorněny na obrázku 14. [18]



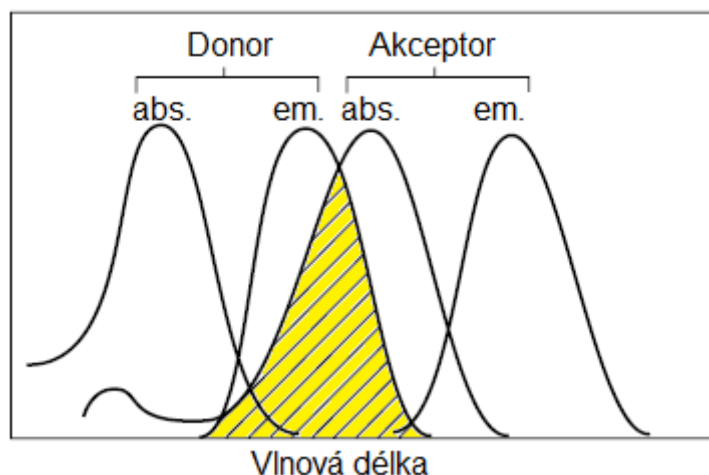
Obr. 14: Statické a dynamické zhášení a jejich rozdíly. [18]

### 2.5.5. Rezonanční přenos energie

Rezonančním přenosem energie se rozumí nezářivý přenos energie mezi molekulou donoru a molekulou akceptoru předpokladu, že se jejich emisní a absorpční spektra překrývají (obr. 15). K přenosu může dojít, pokud některé vibrační přechody donoru mají stejnou energii, jako vibrační přechody v akceptoru, tudíž jsou v rezonanci. Někdy je tento proces nazýván jako Försterův neboli fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET), ovšem korektnější je označení RET, protože dochází pouze k přenosu energie, nikoliv fluorescence. Přenos energie se ovšem skládá ze zářivého i nezářivého procesu. Nezářivý proces je samotný přenos energie mezi donorem a akceptorem a zářivý proces pak nastává při deexcitaci a vyzáření fotonu akceptorem.

Tento přenos může vzniknout na základě různých mechanismů. Interakce mohou být Kolumbického charakteru nebo mohou plynout z překryvu orbitalů molekul. Interakce Kolumbického charakteru mohou být dipól-dipólové na dlouhou vzdálenost (Försterův mechanismus), nebo na krátkou vzdálenost multipolární. Interakce překryvu orbitalů spočívají buď ve výměně elektronu, nebo v rezonanci náboje a jsou pouze na krátkou vzdálenost.





Obr. 15: Znáznornění překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru.[18]

Nejvyužívanější aplikace RET je při určování vzdálenosti dvou míst na makromolekulách, například proteinech. Na protein je kovalentně navázán donor a akceptor, kde donor bývá často tryptofan. Na základě účinnosti přenosu energie pak může být stanovena jejich vzdálenost za předpokladu jejich stabilní vzdálenosti po dobu života donoru. RET bývá dále využíván ke studiu makromolekulárních systémů. Zde jsou systémy sledovány v časové závislosti, protože díky difuzi vzdálenost donoru a akceptoru po dobu života může měnit. [17,18]

#### 2.5.5.1. Účinnost přenosu energie

Jednou z důležitých charakteristik RET je, že probíhá na vzdálenosti, které jsou přibližně stejné jako velikost makromolekul. Vzdálenost, na kterou je účinnost přenosu energie 50% se nazývá Försterův poloměr a obvykle je v rozmezí 20-60 Å. Rychlostní konstanta přenosu energie z donoru na akceptor je definována jako:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (17)$$

kde  $\tau_D$  je doba života donoru bez přítomnosti akceptoru,  $R_0$  je Försterův poloměr a  $r$  je vzdálenost donoru a akceptoru. Pokud rychlost přenosu bude o dost rychlejší, než doba života donoru, bude přenos velice efektivní. Naopak pokud bude menší, bude slabá odpověď, bude přeneseno málo energie a přenos bude neefektivní. Försterův poloměr  $R_0$  je určen jako:

$$R_0 = 0.2108 \left[ \kappa^2 \Phi_D^0 n^{-4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right]^{\frac{1}{6}} \quad (18)$$

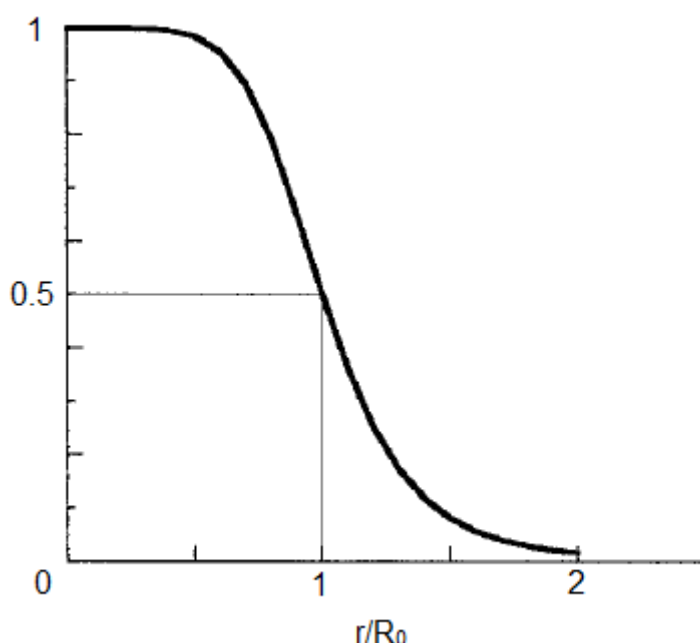
kde  $\kappa^2$  je orientační faktor dosahující hodnot 0 až 4,  $\Phi_D^0$  fluorescenční výtěžek donoru bez přítomnosti akceptoru,  $n$  je index lomu prostředí při vlnové délce, kde je překryv spekter

donoru a akceptoru největší,  $I_D(\lambda)$  jen normalizovaná fluorescence donoru tak, aby  $\int_0^\infty I_D(\lambda)d\lambda = 1$ ,  $\varepsilon_A$  je molární absorpční koeficient a  $\lambda$  je vlnová délka v nanometrech.

Účinnost přenosu energie je poměr energie absorbované donorem a přenesené na akceptor. Poměr je určen pomocí vztahu:

$$\Phi_T = \frac{k_T}{1/\tau_D^0 + k_T} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (19)$$

Šestá mocnina závislosti vysvětluje, proč je přenos energie velice citlivý na vzájemné vzdálenosti donoru a akceptoru. Efektivita přenosu se velice rychle přibližuje jedné, pokud vzdálenost je menší, než Försterův poloměr  $R_0$ . Například pokud je vzdálenost rovna jedné desetině  $R_0$ , efektivita přenosu je pak 0,99999, tudíž není v podstatě pozorovatelná emise donoru. Naproti tomu pokud je vzdálenost vyšší, než  $R_0$ , dochází velmi rychle ke snížení efektivity přenosu. Pokud je například vzdálenost dvojnásobná oproti  $R_0$ , efektivita je 1,56%. Tuto závislost znázorňuje obrázek 16. [18]



Obr. 16: Zobrazení závislosti přenosu energie na vzdálenosti donoru a akceptoru.[18]

#### 2.5.5.2. Určování vzdálenosti pomocí RET

Försterův rezonanční přenos energie může být využit jako pravítko při vzdálenostech od 10 do 100 Å. Vzdálenost by měla být při měření ideálně konstantní během doby života donoru a vyšší než 10 Å, aby nedocházelo k interakcím na krátkou vzdálenost. Pokud budeme předpokládat, že donor a akceptor mohou volně rotovat vysokou rychlostí, rychleji než je rychlost přenosu energie, takže orientační faktor  $\kappa^2$  je pak 2/3 (izotropický dynamický

průměr), můžeme vzdálenost donoru a akceptoru měřit v ustáleném stavu pomocí efektivity přenosu (vztah 19):

$$r = \left( \frac{1}{\Phi_T} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} R_0 \quad (20)$$

K určení efektivity přenosu mohou být využity tři metody v ustáleném stavu. První určuje efektivitu přenosu z úbytku fluorescence donoru, kde v podstatě při přenosu dochází ke snížení kvantového výtěžku donoru. Druhá metoda porovnává absorpční a excitační spektrum akceptoru. Poslední metoda využívá měření intenzity fluorescence akceptoru, která je v přítomnosti RET vyšší. [18]

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1. Rezonanční přenos energie

Rezonanční přenos energie je v poslední době často užívanou technikou pro studium biomolekul a supramolekulárních struktur. Tento proces je silně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru a je realizován pouze ve vzdálenosti od 10 Å do 100 Å a může být využit tam, kde klasická optická mikroskopie nestačí. Je unikátní v tom, že na takto malou vzdálenost dokáže detekovat a kvantifikovat molekulární interakce. [20,21]

Rezonanční přenos energie je výbornou technikou pro studium membrán, membránových fúzí, formování lipidových domén, interakcí membránových proteinů mezi sebou a lipidovými částmi membrány a další. Membrány mají totiž velmi úzké natěsnané prostředí, díky čemuž donor a akceptor zde spolu mohou dobře komunikovat [21]. Například skupina **D.K. Strucka** [22] studovala pomocí této techniky fúzi membrán pomocí lipidických sond NBD a rhodaminu. Při smíchání těmito sondami označených membrán a neoznačených membrán dojde k poklesu rezonanční energie z důsledku oddálení donoru a akceptoru.

Další z klasických využití rezonančního přenosu energie je při studiu struktury proteinů, kdy se měří vzdálenosti mezi definovanými místy v proteinu a jejich shluky v roztoku, z čehož se následně určuje jejich geometrie [21]. Toto využila skupina **Therese Mikaelssona**, která se zabývala studiem sbalování malého ribosomálního proteinu S20 v prostředí zahušťovací látky dextranu. Využili k tomu tryptofan a BODIPY, kde byla pomocí rezonančního přenosu energie měřena vzdálenost mezi tímto donorem a akceptorem a skutečně bylo dokázáno, že za těchto podmínek je nesbalený stav tohoto proteinu kompaktnější. [23]

Poslední dobou se rezonanční přenos energie využívá i při studiu DNA [24], jeho struktury, konformace, hybridizace a automatickému sekvenování. Pokud totiž máme správně definované sekvence DNA oligomerů, můžeme je i jednoduše syntetizovat a zároveň spojit s fluorescenčním označením [21,25]. Například skupina **Xiangninga Chena** využila tuto metodu k vývoji jednoduchého DNA diagnostického testu pro detekci mutací v základním páru při templátové syntéze za využití sond fluoresceinu, ROX a TAMRA. [26]

#### 3.2. RET v koloidních systémech

Pomocí přenosu energie se také zkoumají micelární systémy. Studují se reverzní i normální micely [27-30], vliv nabitých skupin při porovnání role hydrofobní sil s elektrostatickými interakcemi [31, 32], vliv různých koncentrací a tenzidů [33, 34]. Při studiu těchto systému není dobré vycházet čistě z výsledků integrálního překryvu spekter donoru a akceptoru pro měření účinnosti přenosu energie. Jak zjistila skupina **Arnaba Maityho**, tohle by mohlo vést k vážným chybám. U sledování přenosu energie hraje roli několik faktorů dohromady v mikroheterogenním systému. Tomu se ovšem dá předcházet kompromisem mezi agregačním číslem tenzidů a integrálním překryvem [35].

Skupina **F. Garcíe Sáncheze** se zabývala studiem vlivu koncentrace akceptoru na efektivitu přenosu energie za využití fluorescenčního páru perylenu a fluoresceinu a vlivu pH na kritickou micelární koncentraci a micelární agregační číslo. Kritická micelární koncentrace byla stanovena za pomoci pyrenu a agregační číslo pomocí procesu přenosu energie. [32]

Na tento proces má také vliv tvar micel a na koncentraci akceptoru [36-38]. Skupina **S. L. Bhattara** se zabývala studiem fluorescenčním rezonančním přenosem energie mezi perylenem a riboflavinem v micelárním roztoku dodecylsulfátu sodného. Kinetické studie prokázali zde platnost Stern-Volmerovy rovnice. Bylo zjištěno, že účinnost přenosu energie se zvyšuje s koncentrací riboflavinu. Na základě tohoto měření je postavena i velice jednoduchá metoda pro stanovení vitamínu B2 ve farmaceutických tabletách [37].

Skupina **B. M. Aydina** studovala přenos energie z fluoresceinu na merocyanin 540 v prostředí micelárních roztoků vodného dodecylsulfátu sodného, CTAB, Triton X-100 a zároveň v deionizované vodě s využitím Stern-Volmerovy i Försterovy teorie a obě se ukázaly správné. Byly použity různé koncentrace akceptoru, přičemž při nejvyšší koncentraci byla nejlepší efektivita přenosu energie. Při výpočtech se ukázalo, že kritický Försterův poloměr je nejvyšší oproti ostatním, zatímco vzdálenost mezi donorem a akceptorem naopak nejnižší, což bylo pravděpodobně způsobeno elektrostatickou interakcí mezi barvivou a micelami. K neefektivnějšímu přenosu energie docházelo ve vodném roztoku CTAB [38].

Tým **S. Chatterjee** studoval přenos energie a vliv viskozity na něj mezi fluoresceinem a safraninem T rozpuštěných ve vodném roztoku a v micelárním roztoku CTAB. Viskozita byla měřena v alkanolech. Z výsledků bylo patrné, že čím vyšší viskozitu má prostředí, tím je účinnost přenosu energie vyšší [39].

Vědecká skupina **P. Dase** též prokázala, že přenos energie je velice efektivní i v případě micelárních systémů, kdy jako donor je využit samotný tenzid. Byl pozorován přenos energie mezi tenzidem a AODIQ v micelární prostředí a za podmínek, kdy se micely ještě netvořily. Bylo zjištěno, že v micelárním prostředí se efektivita pozoruhodně zvýšila [40].

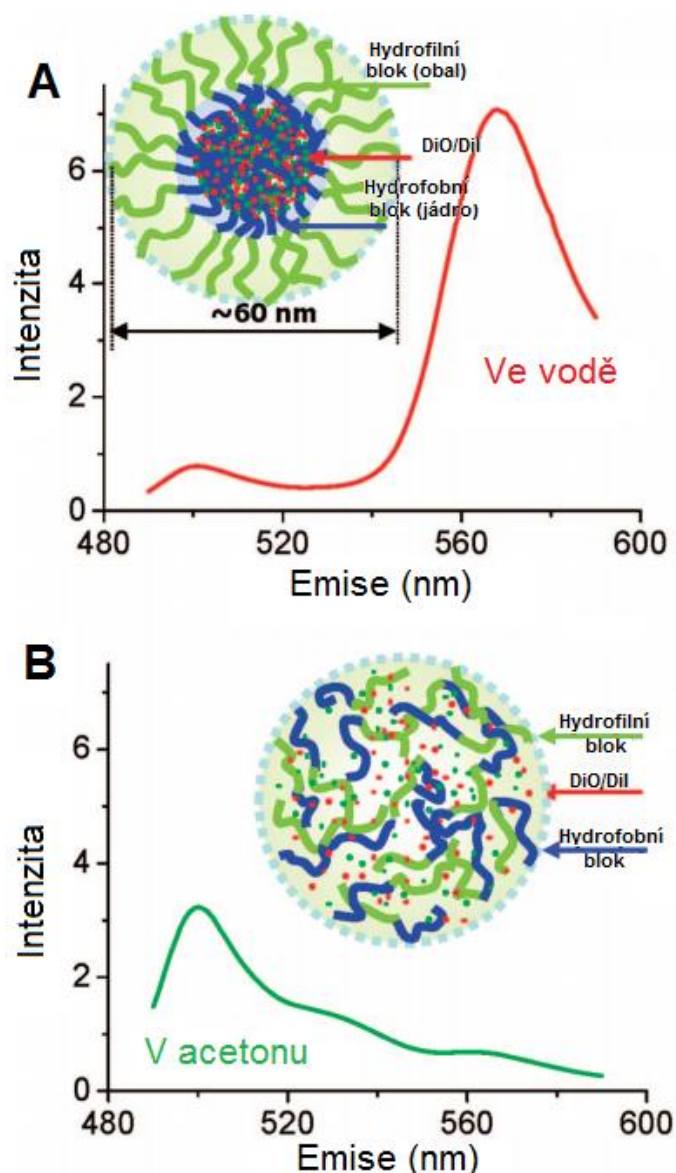
Studium přenosu energie se dá také využít při zjišťování chování a stability léčiv v různých systémech [41-44]. Skupina **Jing Wanga** se v jedné části své práce zabýval právě studiem stability takových systémů pomocí této techniky, kdy porovnávaly stabilitu prázdných polyethylglykolovaných fosfolipidových micel oproti těmto micelám s doxorubicinem. Ukázalo se, že micely s doxorubicinem jsou stabilnější, než prázdné micely a zachovávají si integritu i v prostředí séra a krve. To je pravděpodobně z důvodu, že kationové amfifilní léčivo přidává další hydrofobní síly ke stabilizování struktury a navíc elektrostatické interakce mezi aminovými a fosfátovými skupinami nahrazují repulzní síly mezi samotnými fosfátovými skupinami. Výsledkem jsou pak micely uniformní a stabilní micely s kontrolovatelným uvolňováním léčiva [41].

**Wei Wei Wang a spol.** vyvinuli injektabilní, termosenzitivní hydrogel s velkým množstvím jednotlivých částí skládajících se z kooperativních a nekompatibilních polyethylglykolovaných fluorouhlíkových nanočástic a polyethylglykolovaných uhlovodíkových nanočástic. Toto kooperativní shlukovací chování bylo studováno právě pomocí metody rezonančního přenosu energie. Výsledky demonstrovaly, že nekompatibilní nanočástice skutečně vytvořily mnoho kompartmentů. Do nich byly následně enkapsulovány léčiva paclitaxel a doxorubicin, kde se zjistilo, že obě léčiva jsou od sebe separovány a následně uvolňovány každé svým mechanismem a nedochází k výměně mezi kompartmenty. Celý tento systém má sloužit jako pomocná terapeutická platforma při léčbě rakoviny [42].

Skupina **Daniely Šmejkalové** se zabývala studiem hyaluronanových micel pomocí přenosu energie a jejich transportem skrz kůži. Micely byly připraveny z hydrofobizovaného hyaluronanu. Jako fluorescenční pár byl využit DiI, oranžovo-červený lipofilní akceptor a DiO, zelený lipofilní donor. Obě lipofilní sondy se nacházely v jádru micel a bylo sledováno jejich uvolňování. Zde bylo díky této technice zjištěno graduální rozložení micel v závislosti

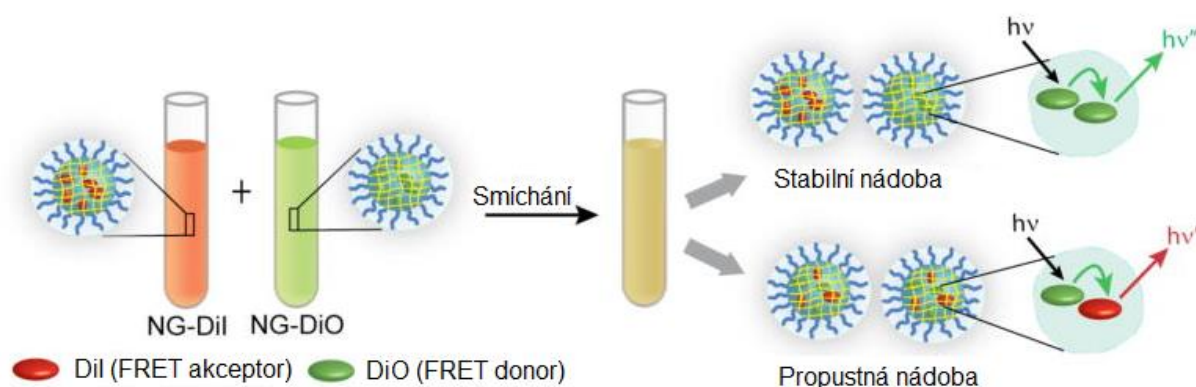
na hloubce kůže. Bylo také vypořádováno, že hyaluronanové micely způsobují zlepšení propustnosti pro obsažené látky, kde navíc tyto micely jsou následně stabilní při aplikaci jako krém a mají tudíž velký potenciál pro využití, jako topické transportní systémy pro hydrofilní kosmetické a farmaceutické látky [44].

Metodu RET pro své studium využil také vědecký tým **H. Chena**. Studovali potencionální uvolňování léčiv z kopolymerových micel, kdy místo lipofilního léčiva použili dvojici fluorescenčních sond DiI a DiO. Tento systém byl měřen v průběhu několika hodin po vstříknutí do krevního systému myši a ukázalo se, že již po krátké chvíli dochází k výraznému snížení fluorescence. Byl též měřen i v nepolárním prostředí a rozdíl je zachycen na obrázku 17. Je tudíž patrné, že pokud dochází k takovému rychlému uvolňování z micel za podmínek *in vivo*, je potřeba upravit tyto micely, aby byly stabilnější a uvolňování léčiva kontrolovanější [45].



Obr. 17: Fluorescenční spektra micel s párem DiO/DiI rozpuštěných ve vodě (A) a v acetonu (B).

Fluorescenční pár DiO a DiI využila ke svému studiu také skupina **S. Jipwanicha**. Pomocí analýzy RET mezi těmito dvěma fluorofory, kde DiO funguje jako donor a DiI jako akceptor, studovali propustnost a dynamiku výměny látek v micelách v nanogelech. Předpokládali, že RET bude měřitelný v případě, že k výměně látek bude docházet, protože připravili DiO a DiI zvlášť v micelárních roztocích a pak je smíchali dohromady. Díky této analýze dokázali, že jejich nanogely jsou schopné uvolňovat stabilně enkapsulované látky na vnější podnět. Tyto studie ohledně dynamiky výměny látek jsou základním bodem při zkoumání nosičů léčiv a jejich řízenému uvolňování [46].



Obr. 18: Zobrazení principu přenosu energie z DiO na DiI při smíchání jejich nanogelů

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1. Materiály

Hyaluronan	HyA $M_w = 340$ kDa, native, CPN s.r.o., š. 230215-E1 HyA $M_w = 1540$ kDa, native, CPN s.r.o., š. 181214-4-D1
Tenzid	Septonex, Carbethopendecinium bromide, GNB chem, a.s., š. 910SEP002
Fluorescenční sondy	Perylen, $\geq 99,0\%$ , Fluka, š. 2059009 Disodná sůl fluoresceinu, $\geq 99,0\%$ , Fluka, š. 2082530 DiO, $\geq 99,0\%$ , BioChemika, Fluka, š. 42367
Rozpouštědla	čistá voda, Millipore: Milli-Q NaCl, chlorid sodný, Penta s.r.o., š. 1903200314 Metanol, Lach-ner s.r.o., š. PP/2008/00031/0 Aceton, Penta, s. 1308200810

### 4.2. Metody

#### 4.2.1. Příprava zásobních roztoků fluoroforů

Nejprve byl připraven první zásobní roztok perylenu v acetonu s koncentrací 0,8 mM. Z tohoto roztoku bylo následně odpipetováno a odpařeno takové množství perylenu, aby při přidání 200 mM septonexu byla výsledná koncentrace finálního zásobního roztoku perylenu 1  $\mu$ M. Roztok byl promícháván jeden týden.

Zásobní roztok fluoresceinu byl připraven tak, aby jeho koncentrace byla 1 mM v 0,15 M chloridu sodném. Pro přípravu zásobního roztoku DiO byl vymyt 5 ml acetonu veškerý zbytek sondy ze zásobní ampulky. Výsledná koncentrace 56,5 mM byla stanovena pomocí UV-VIS spektrometrie, kdy se z původního roztoku DiO odebralo 20  $\mu$ l, toto množství bylo odpařeno a doplněno 5 ml metanolu, kde byla změřena koncentrace.

#### 4.2.2. Příprava vzorků pro měření doby života

Byly připraveny tři vzorky pro první měření dob života u dvojice perylen a fluorescein, aby se zjistilo, jestli tento systém je funkční. Roztoky byly namíchány tak, aby koncentrace fluoresceinu byla 70, 35 a 10  $\mu$ M v prostředí 0,15 M roztoku NaCl a následně přidán perylen tak, aby jeho koncentrace ve vzorku byla 20 nM. Následně bylo připraveno pro další měření šest vzorků s koncentracemi 70, 50, 35, 20, 10 a 5  $\mu$ M ve stejném prostředí a se stejnou koncentrací perylenu. Pro měření vlivu času po smíchání donorní a akceptorní sondy byly připraveny vzorky fluoresceinu o koncentracích 50, 20 a 10  $\mu$ M opět v 0,15 M NaCl a měření bylo prováděno ihned po přidání perylenu.

Ze zásobního roztoku DiO bylo odebráno a odpařeno potřebné množství pro přípravu 25, 50 a 175  $\mu$ M koncentrace sondy ve vzorcích v prostředí 200 mM septonexu. Vzorky byly 3 dny míchány. Následně pak byl přidán perylen tak, aby jeho koncentrace byla opět 20 nM.

#### 4.2.3. Příprava gelů pro měření rezonančního přenosu energie

Pro měření rezonančního přenosu energie bylo připraveno celkem 12 vzorků podle tabulky 1. Všechny vzorky obsahovaly perylen o koncentraci 20 nM. Nejprve byly připraveny roztoky, které byly 3 dny míchány a vzorky s DiO ještě ke konci několik hodin zahřívány



k 60 °C. Koncentrace fluoresceinu ve vzorcích byla 50  $\mu\text{M}$  a koncentrace DiO ve vzorcích byla kvůli špatné rozpustnosti sondy stanovena na UV-VIS spektrometru. Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 1. Následně byl přidán 2% roztok hyaluronanu v poměru 1:1 pro tvorbu gelů a tyto výsledné vzorky byly 2 dny skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

Tab. 1 Vzorky, které byly připraveny pro měření rezonančního přenosu energie v gelech.

Vzorek	$c_{\text{septonex}}$ (mM)	Sonda	$c_{\text{sonda}}$ ( $\mu\text{M}$ )	Hyaluronan $M_w$ (kDa)
1	50	Fluorescein	50	340
2	50	DiO	5,6	340
3	100	Fluorescein	50	340
4	100	DiO	14,1	340
5	200	Fluorescein	50	340
6	200	DiO	23	340
7	50	Fluorescein	50	1540
8	50	DiO	4,9	1540
9	100	Fluorescein	50	1540
10	100	DiO	14,8	1540
11	200	Fluorescein	50	1540
12	200	DiO	22,4	1540

### 4.3. Měření

Absorpční spektra DiO, ze kterých bylo určeno absorpční maximum a díky němu spočítána koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona, byla měřena na HITACHI U-3900H UV-VIS spektrometru. Rozsah spektra byl měřen v rozmezí 300-700 nm. Pro excitaci vzorku se v tomto přístroji využívá halogenové lampy pro viditelnou oblast a deuteriové zářivky pro UV oblast.

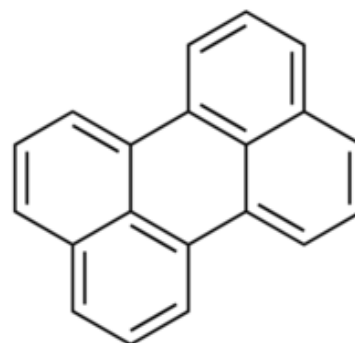
Doby života perylenu za přítomnosti akceptorů sondy byly pozorovány na fluorometru FluoroCube. Pro excitaci perylenu byl použit laser o vlnové délce 389 nm. Rozsah, ve kterém byla měřena intenzita fluorescence, byl  $450 \pm 16$  nm.

Rezonanční přenos energie v gelových systémech byl pozorován na přístroji MicroTime 200, mikroskopu pro časově rozlišenou fluorescenci. Pro excitaci donoru byl využit laser o vlnové délce 405 nm. Pro donor byl využit emisní filtr 440/40 nm a pro akceptor 520/35 nm. Vyhodnocení pak probíhalo v programu SymphoTime64, a to pouze donorového kanálu a změn dob života.

### 4.4. Vlastnosti použitých fluoroforů a jejich spektra

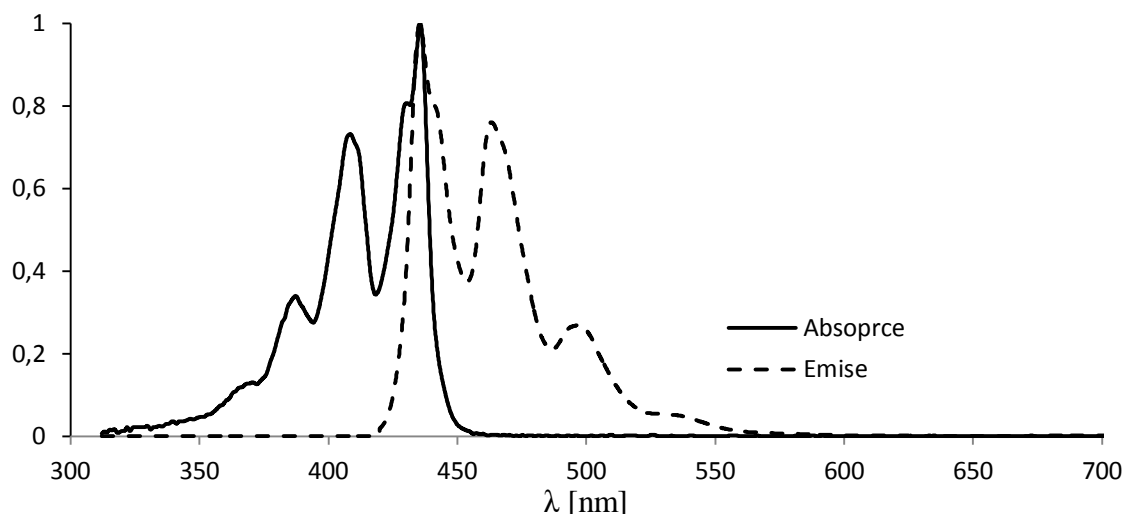
#### 4.4.1. Perylen

Perylen je hydrofobní fluorofor (obr. 18), který je v této práci využit jako donor při studiu rezonančního přenosu energie. Díky hydrofobicitě je totiž solubilizovatelný v micelách. Jeho emisní spektrum se překrývá s absorpčními spektry sond fluoresceinu i DiO. Byl již



Obr. 19: Perylen

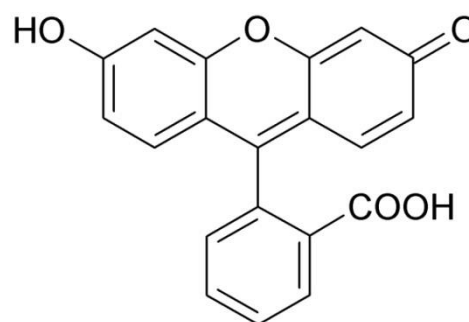
například využít při studiu RET s vitamínem B2 v micelárním roztoku [37]. Absorpční a excitační spektrum je na obrázku 19.



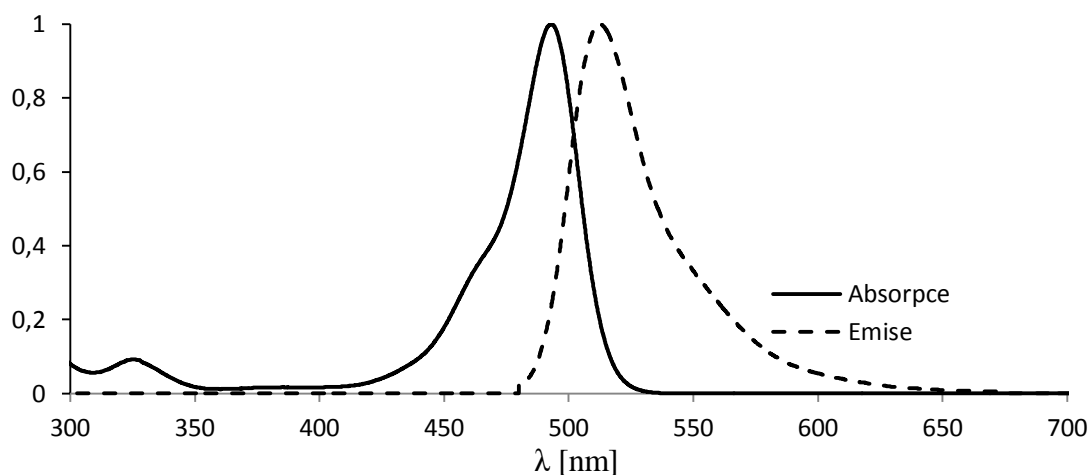
Obr. 20: Absorpční a excitační spektrum peryleny. [47]

#### 4.4.2. Fluorescein

Fluorescein je velice často používaná fluorescenční sonda. Je velice fotostabilní s vysokou intenzitou fluorescence. Je dostupný v mnoha různých derivátech a využívá se například jako značkovací proteinů a jiných biomolekul. Jeho excitační maximum (494 nm) je blízké argonovému laseru (488 nm), tudíž je velice důležitou sondou v konfokální laserové mikroskopii a průtokové cytometrii. Je dobře rozpustný hlavně ve vodě. Jeho fluorescence je velice závislá na pH prostředí. Ve vodném prostředí se vyskytuje ve formě kationu, anionu, dianionu a neutrální molekuly [48,49]. Molekula je zobrazena na obrázku 20. Absorpční spektrum je zobrazeno na obrázku 21.



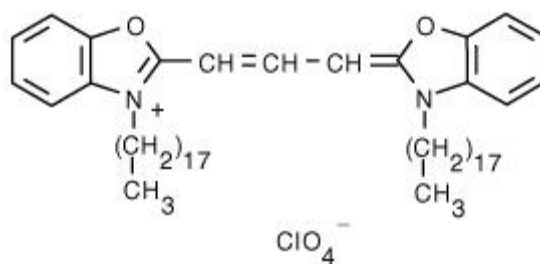
Obr. 21: Fluorescein



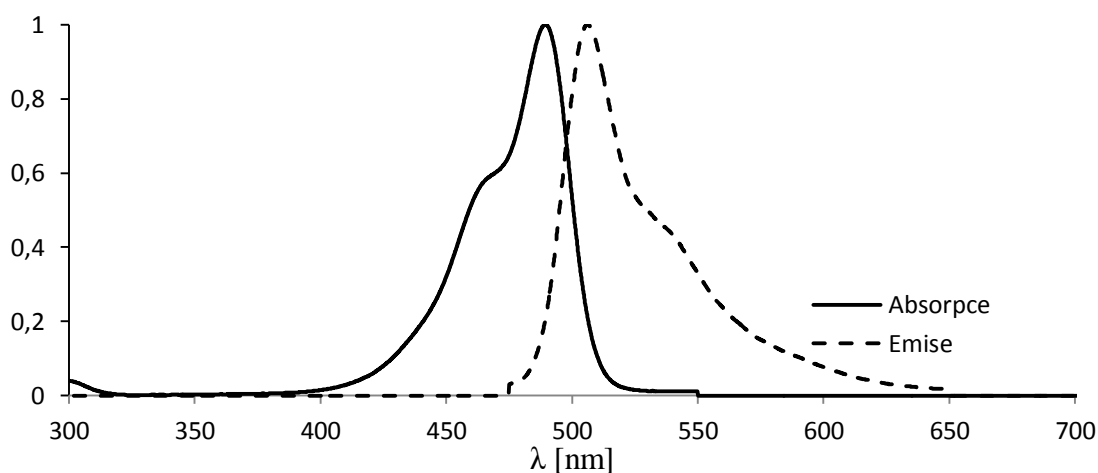
Obr. 22: Absorpční a excitační spektrum fluoresceinu. [47]

#### 4.4.3. DiO

DiO (obr. 22), neboli 3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát, patří mezi karbokyaniny, nejvíce absorbující barviva. Charakter této sondy určuje délka alkylového řetězce. V našem případě se jedná o dlouhý alkylový řetězec o délce 18 uhlíků. Správné značení je poté DiOC<sub>18</sub>(3) a číslo v závorce je počet uhlíků mezi indolinem a benzoxazolem. Sonda je následně lipofilní a používá se pak primárně ke studiu membránových systémů, do kterých se zabudovává. V tomto nepolárním prostředí je na rozdíl od polárního vysoce fotostabilní a má vysokou intenzitu fluorescence [50]. Absorpční a excitační spektrum je na obrázku 23.



Obr. 23: DiO

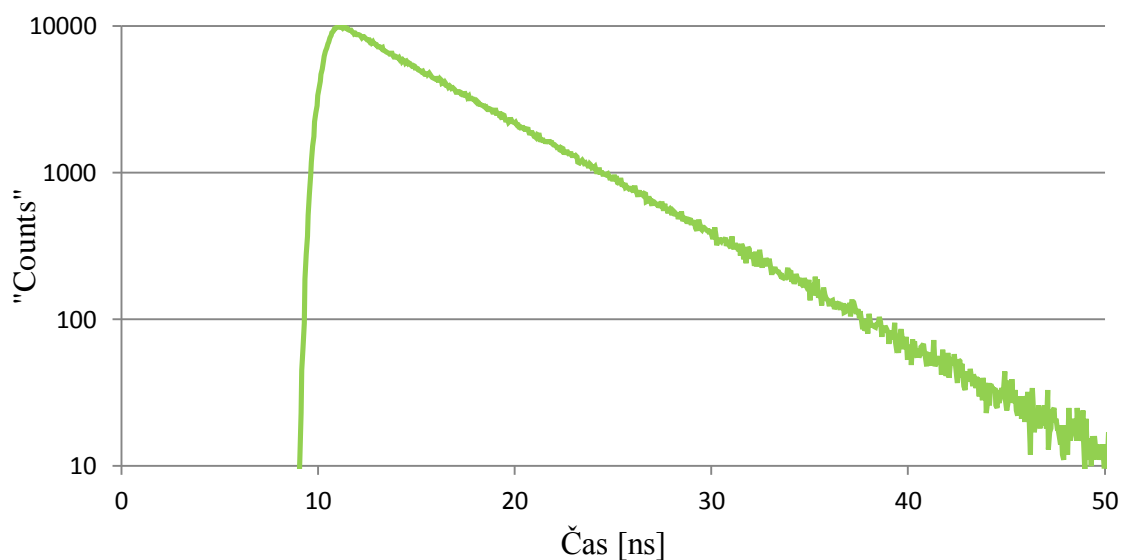


Obr. 24: Absorpční a excitační spektrum DiO. [47]

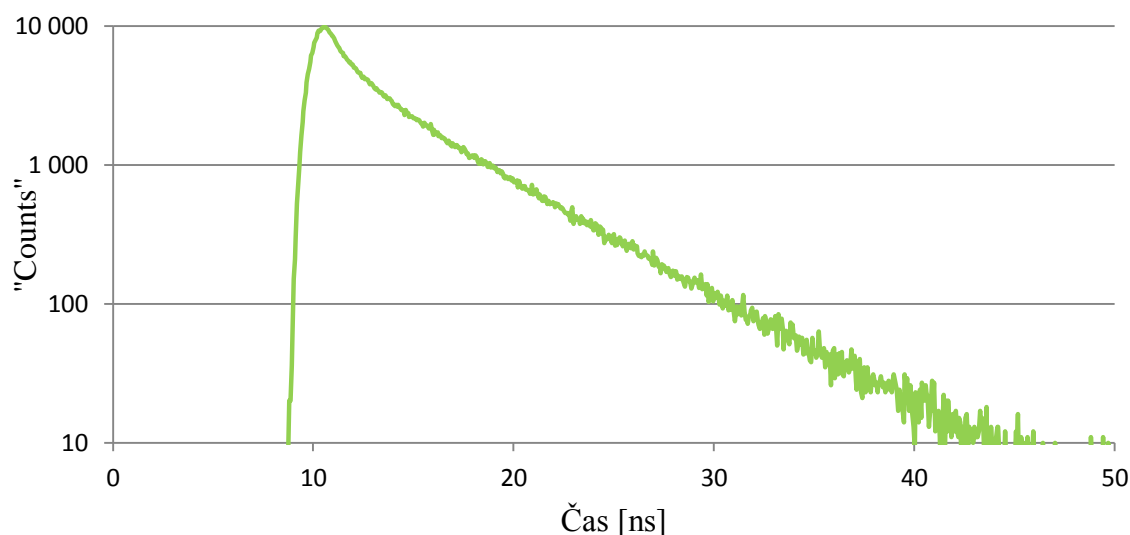
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Sledování RET mezi perylenem a fluoresceinem a vliv různých koncentrací

V první řadě byl zkoumán vliv fluoresceinu na dobu života perylenu. Pro tento účel byly připraveny 3 zkušební vzorky o koncentracích fluoresceinu 70, 35 a 10  $\mu\text{M}$  s koncentrací 20 nM perylenu v prostředí 0,15 M NaCl. Nejprve byl proměřen samostatně roztok perylenu, kde při monoexponenciálním vyhodnocení byla naměřena doba života perylenu 5,73 ns (obr. 24). Následně byly měřeny vzorky s perylenem i fluoresceinem, kde byly při biexponenciálním vyhodnocení nalezeny 2 doby života. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.



Obr. 25: Zobrazení excitace a dohasínání perylenu pro vyhodnocení jeho doby života.



Obr. 26: Zobrazení excitace a dohasínání perylenu ve vzorku s fluoresceinem s koncentrací 70 mM pro vyhodnocení jeho doby života.

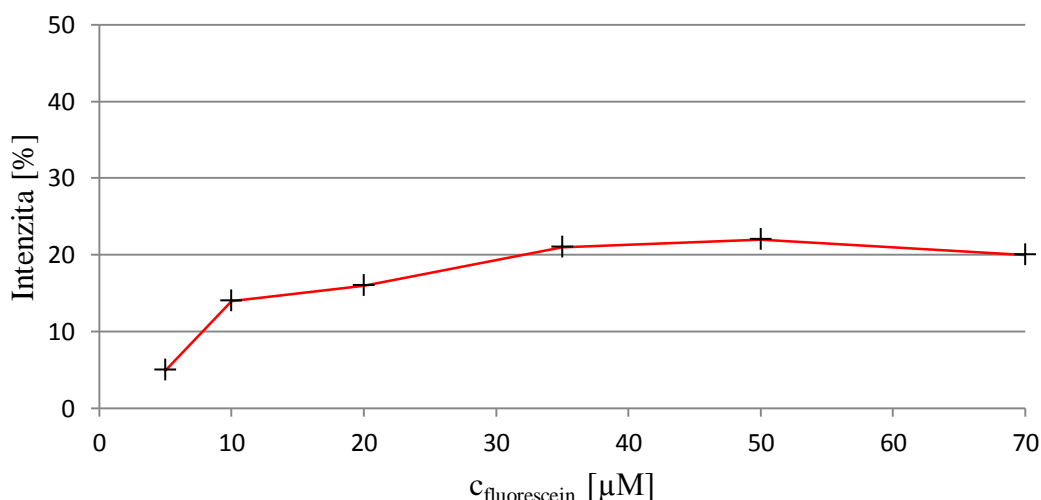
Tab. 2 Výsledky měření zkušebních vzorků. Doba života donoru je značena  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  značí dobu života zhasené molekuly donoru,  $A_1$  a  $A_2$  značí procentuální zastoupení nezhasených a zhasených molekul donoru ve vzorku.

$C_{\text{fluorescein}} [\mu\text{M}]$	$\tau_1 [\text{ns}]$	$\tau_2 [\text{ns}]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$
10	5,7	1,6	88	12
35	5,3	1,4	79	21
70	5,2	1,3	76	24

Hodnoty v tabulce 2 potvrzují, že mezi perylenem a fluoresceinem skutečně dochází k rezonančnímu přenosu energie. Intenzita RET, neboli tedy míra vázání akceptoru na donor, koreluje s koncentrací akceptoru ve vzorcích. Proto byla následně připravena a měřena koncentrační řada vzorků fluoresceinem s perylenem. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3. Tyto hodnoty vykazaly závislost intenzity RET na koncentraci akceptoru ve vzorcích. Závislost je lépe zobrazena na obrázku 25. Intenzita s rostoucí koncentrací rychle roste, ale zastavuje se přibližně kolem 20%. Pravděpodobně tedy již s vyšší koncentrací nedochází už dále k častějším interakcím mezi donorem a akceptorem. Dochází pouze k nepatrnému snižování doby života zhaseného i nezhaseného donoru, což mohlo znamenat, že přenos energie není větší, pouze k němu dochází na nepatrně kratší vzdálenost.

Tab. 3 Výsledky měření koncentrační řady. Doba života donoru je značena  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  značí dobu života zhasené molekuly donoru,  $A_1$  a  $A_2$  značí procentuální zastoupení nezhasených a zhasených molekul donoru ve vzorku.

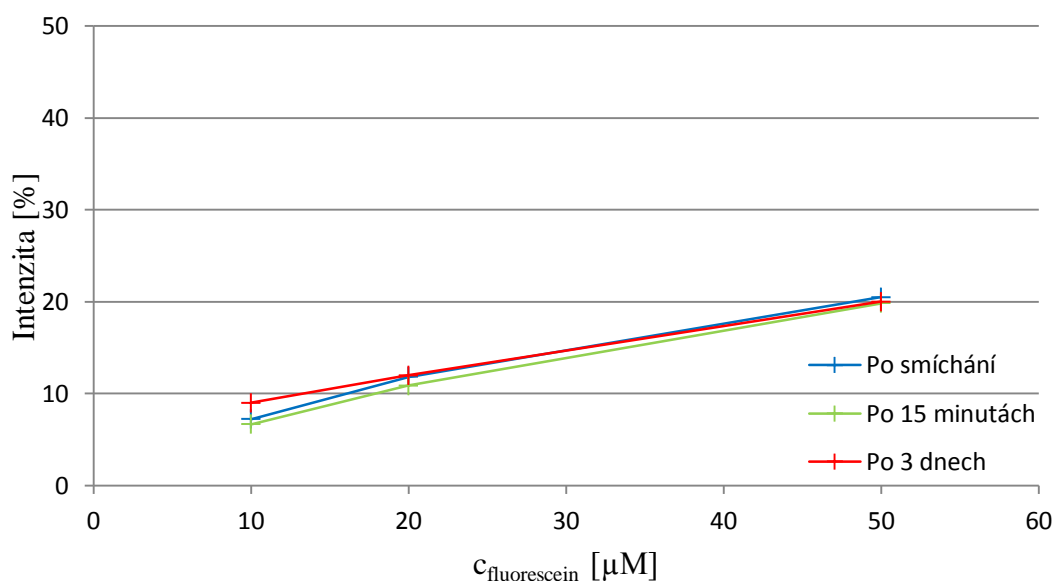
$C_{\text{fluorescein}} [\mu\text{M}]$	$\tau_1 [\text{ns}]$	$\tau_2 [\text{ns}]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$
5	5,8	1,6	95	5
10	5,7	1,4	86	14
20	5,5	1,4	84	16
35	5,3	1,3	79	21
50	5,2	1,3	78	22
70	5,1	1,3	80	20



Obr. 27: Graf závislosti intenzity na koncentraci akceptoru. Intenzitou se rozumí procentuální zastoupení donoru v přítomnosti RET.

## 5.2. Časový vliv na přenos energie

Byly připraveny 3 vzorky fluoresceinu s koncentrací 10, 20 a 50  $\mu\text{M}$  v 0,15 M NaCl. K těmto vzorkům bylo přidáno stejné množství perylenu a vzorky byly měřeny ihned po smíchání, po 15 minutách a po 3 dnech a bylo pozorováno, jestli čas od smíchání donoru a akceptoru má nějaký vliv na RET. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 26. Původní teorie předpokládala, že efektivita bude po smíchání menší, než dojde k difuzi fluoresceinu a sorpci na micely, aby byl RET umožněn. Z výsledků je patrné, že na účinnost časový odstup nemá v podstatě žádný vliv a k přenosu dochází okamžitě, což tuto teorii vyvrací.

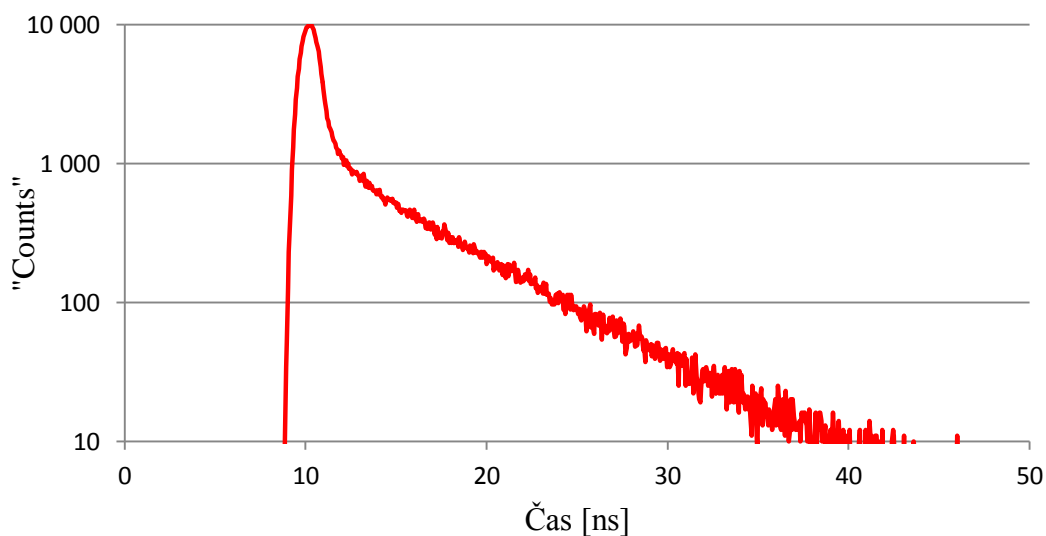


Obr. 28: Porovnání časového vlivu na intenzitu rezonančního přenosu energie. Hodnoty zůstávají pro všechny 3 vzorky prakticky stejné.

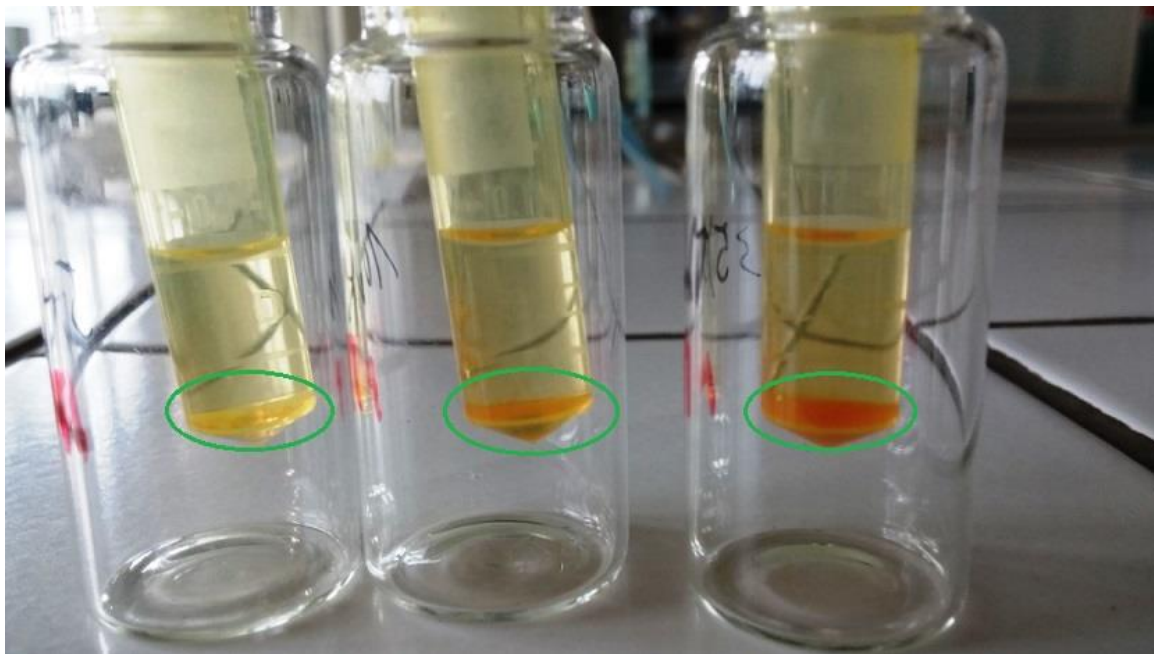
## 5.3. Sledování RET mezi perylenem a DiO

Při smíchání micel obsazených perylenem a micel obsazených DiO bude docházet k RET pouze v případě, když nastane výměna látek v těchto micelách. Pokud by se tak nestalo, perylen a DiO by byly ve velké vzdálenosti a k RET by nedocházelo.

Pro sledování přenosu energie mezi perylenem a DiO byly připraveny vzorky DiO o třech různých koncentracích 25, 50 a 175  $\mu\text{M}$  a koncentrací perylenu 20 nM v prostředí 200 mM septonexu. Hodnoty, které byly naměřeny pomocí FluoroCube, ukázaly přenos energie mezi s intenzitou mezi 15% a 45%. Intenzita ovšem u některých vzorků nekorelovala s koncentrací, jak bylo očekáváno. U koncentrace 50  $\mu\text{M}$  byla nižší, než u koncentrace 25  $\mu\text{M}$ . U koncentrace 175  $\mu\text{M}$  byla už ale mnohem vyšší. Výsledky z měření pomocí FluoroCube se ovšem nedají považovat za přesvědčivé, protože se ukázalo, že DiO má velice nízkou rozpustnost a docházelo k usazování této sondy (obr. 27) v roztoku z neznámého důvodu. Každopádně výsledky potvrdily, že mezi perylenem a DiO dochází k přenosu energie a pravděpodobně s rostoucí koncentrací roste efektivita více, než s fluoresceinem. S rostoucí koncentrací by totiž měl růst počet obsazených micel sondou, a tudíž by měla být vyšší pravděpodobnost přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Doba života zhaseného perylenu se pohybovala kolem  $1,4 \pm 0,3$  ns.

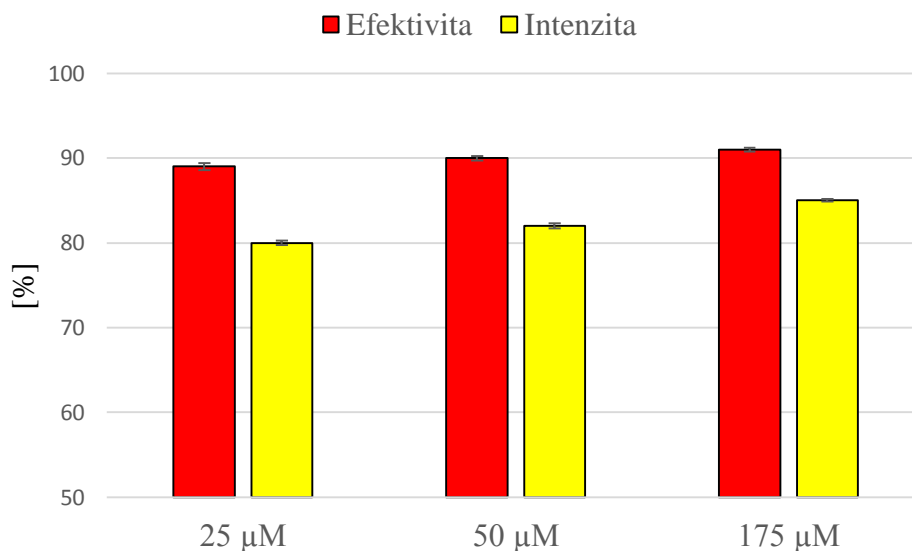


*Obr. 29: Zobrazení excitace a dohasínání perylenu ve vzorku s DiO s koncentrací 25 mM pro vyhodnocení jeho doby života.*



*Obr. 30: Pozorování nežádoucího jevu ve vzorcích s DiO*

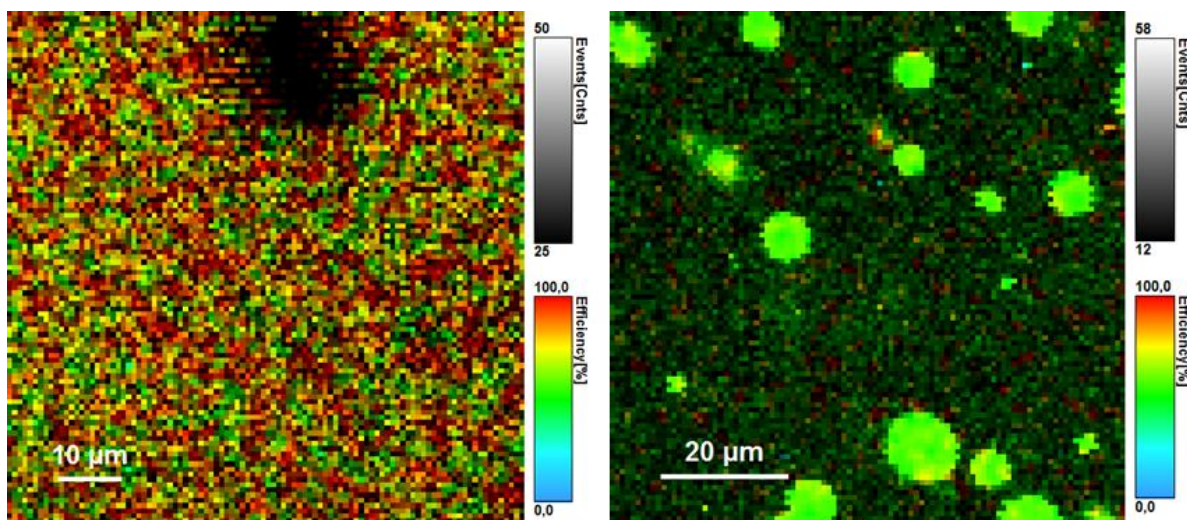
Vzhledem k problémům s rozpustností byly vzorky s DiO následně měřeny i na přístroji MicroTime 200 detailnější FRET analýzou. Výsledky ukazují, že efektivita i intenzita se prakticky nemění, pouze nepatrně. Zastoupení molekul donoru, u kterých probíhá RET je tudíž stále stejný, pouze 15 – 20% donoru je neovlivněno. Vzhledem k tomu, že perylen je nepolárního a DiO amfifilního charakteru, dá se očekávat, že se budou nacházet v nepolárních regionech, tudíž v jádrech a obalu micel. RET poté může probíhat na velice krátkou vzdálenost, čemuž i odpovídá výsledná měřená efektivita, která se pohybuje kolem 90%.



Obr. 31: Výsledky vyhodnocení RET na přístroji MicroTime 200.

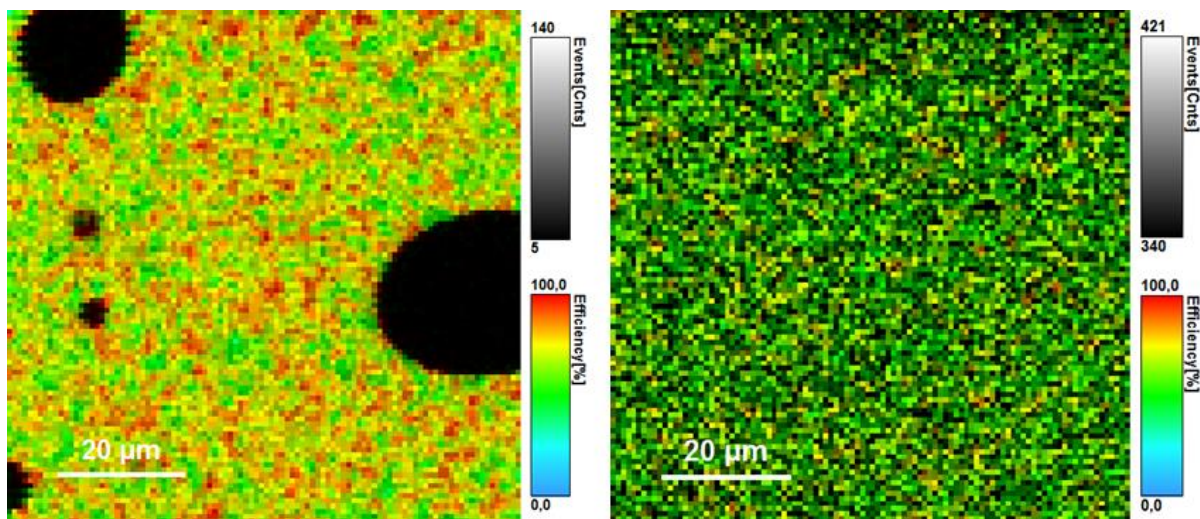
#### 5.4. Měření RET v hyaluronanových hydrogelech

Pro sledování RET v hydrogelech byl vybrán hyaluronan o molekulové hmotnosti 340 kDa a 1540 kDa a celkem bylo připraveno 12 různých gelových systémů, jejichž složení je uvedeno v tabulce 1. Následné obrázky efektivity RET porovnávají rozdíl při požití vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu při tvorbě gelu.

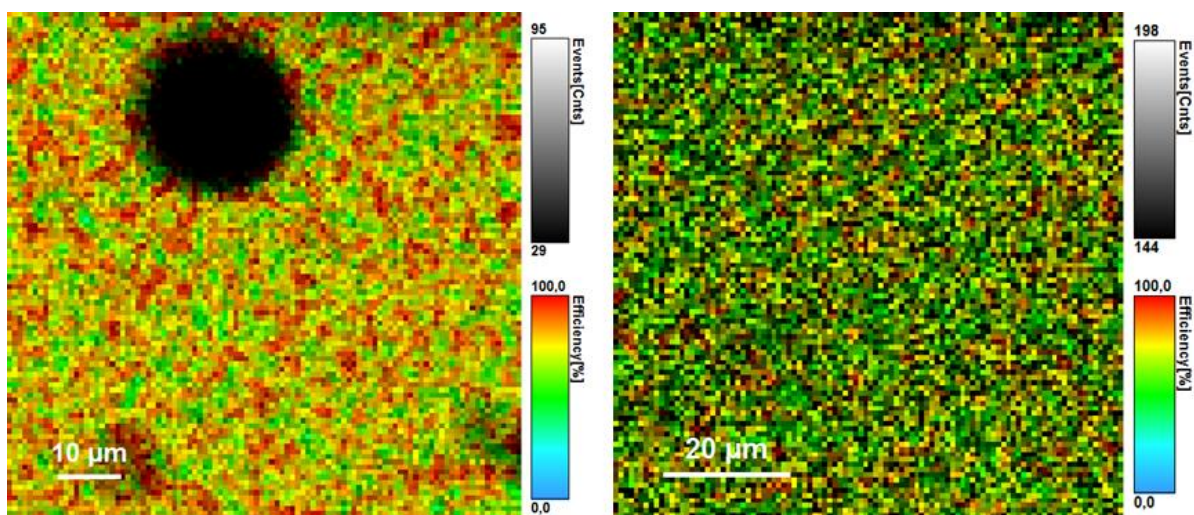


Obr. 32: Pozorování RET v gelech s fluoresceinem. Na levé straně je fluorescein v 50 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně se stejnou koncentrací s 1540 kDa hyaluronanem.



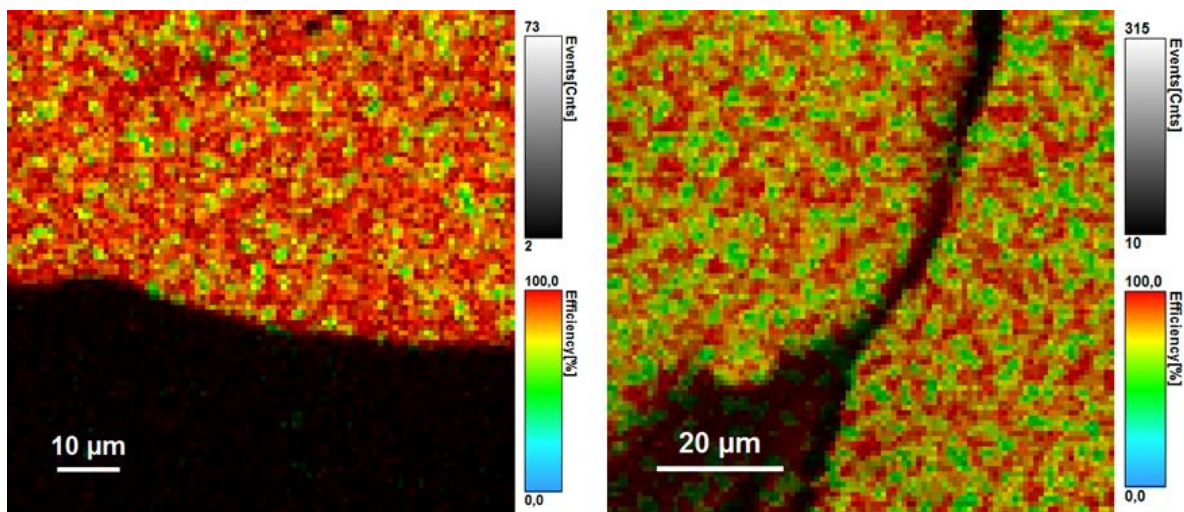


Obr. 33: Pozorování RET v gelech s fluoresceinem. Na levé straně je fluorescein v 100 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně se stejnou koncentrací s 1540 kDa hyaluronanem.

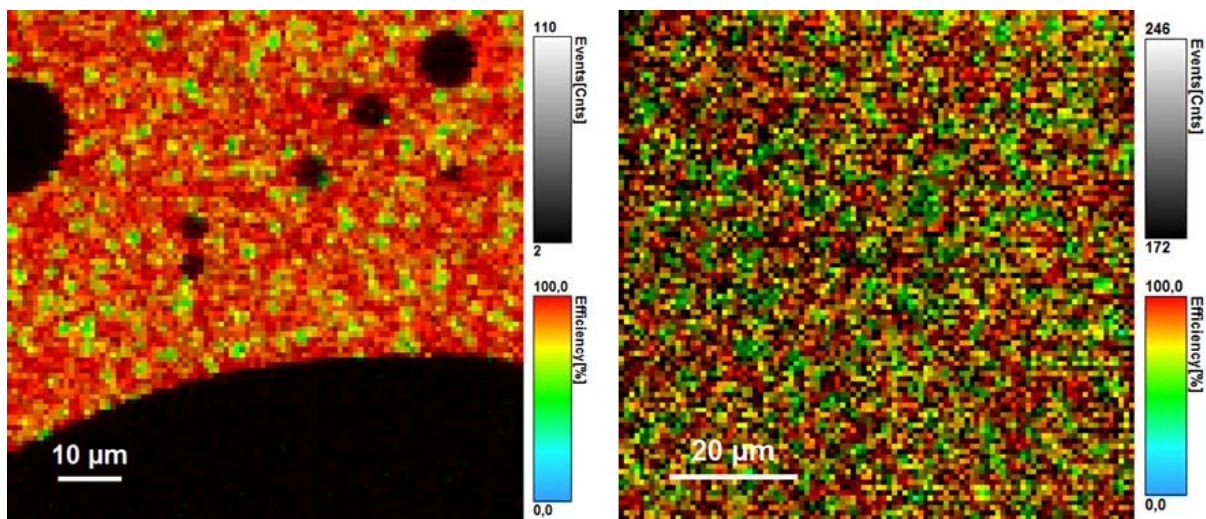


Obr. 34: Pozorování RET v gelech s fluoresceinem. Na levé straně je fluorescein v 200 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně se stejnou koncentrací s 1540 kDa hyaluronanem.

U prvních třech obrázků vidíme rozdíly různého hyaluronanu v gelech, kde byl jako akceptor použit fluorescein. Tmavá místa zobrazují bubliny v gelu, které se vytvořili při jeho přípravě. Při porovnání nízkomolekulárního hyaluronanu převažuje žlutá až červená zatímco u vysokomolekulárního hyaluronanu více zelená. Dá se tedy říci, že ve vzorcích s 340 kDa hyaluronanem dochází k efektivnějšímu RET. Je ovšem zajímavé, že vzorek, který obsahoval hyaluronan o molekulové hmotnosti 1540 kDa a septonex o koncentraci 50 mM se jako jediný od ostatních patrně odlišuje. Dle obrázku 29 z RET analýzy obsahuje shluky, místa kde dochází přibližně k 50% efektivitě RET, což znamená, že fluorescein je zde ve Försterově vzdálenosti od peryleu. Tyto shluky pravděpodobně jsou pouze nehomogenity v připraveném gelu.

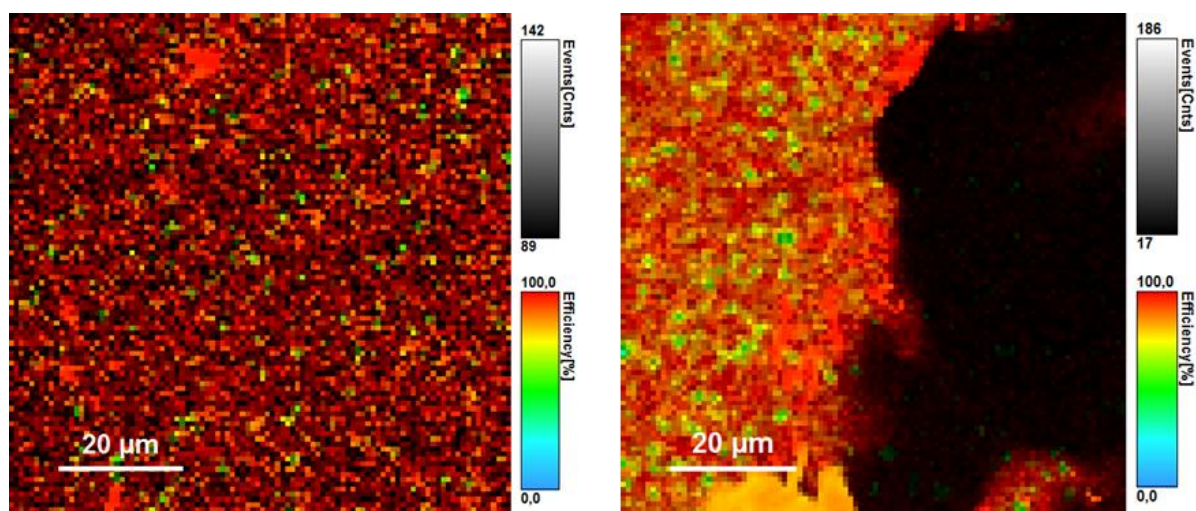


Obr. 35: Pozorování RET v gelech s DiO, na levé straně je DiO v 50 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně je DiO za stejných podmínek s 1540 kDa hyaluronanem.



Obr. 36: Pozorování RET v gelech s DiO, na levé straně je DiO v 100 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně je DiO za stejných podmínek s 1540 kDa hyaluronanem.





Obr. 37: Pozorování RET v gelech s DiO, na levé straně je DiO v 200 mM septonexu s 340 kDa hyaluronanem, na pravé straně je DiO za stejných podmínek s 1540 kDa hyaluronanem.

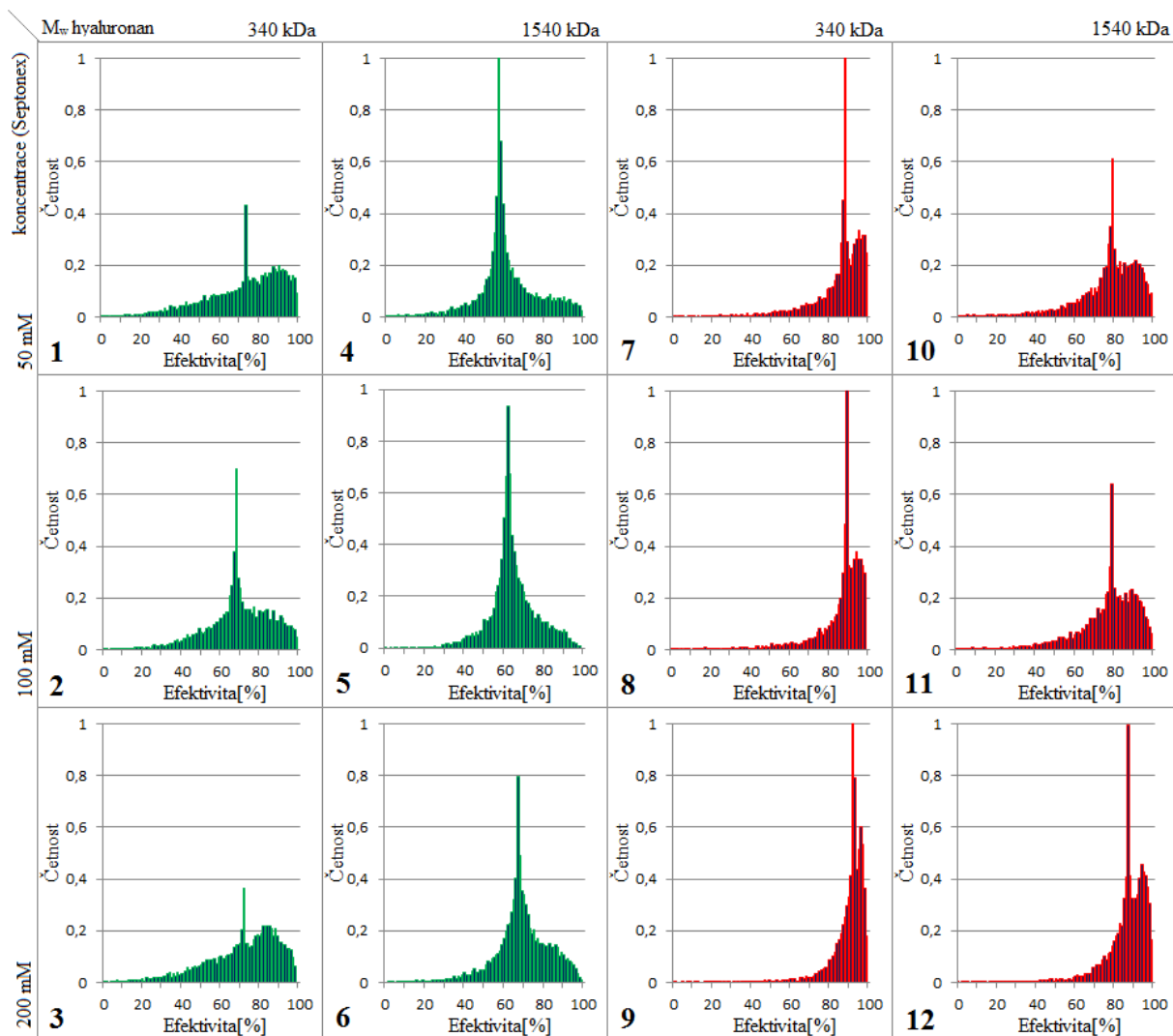
U dalších třech obrázků je vidět efekt jiné molekulové hmotnosti hyaluronanu v gelech s DiO. Při barevném porovnání dochází ke stejnému jevu, jako v případě gelů s fluoresceinem. Z toho tudíž opět vyplývá, že ve vzorcích, obsahujících hyaluronan s molekulovou hmotností 340 kDa, dochází k vyšší efektivitě RET. Opět dochází k odchýlení jednoho vzorku a to gelu, který obsahoval hyaluronan o molekulové hmotnosti 1540 kDa a tenzid o koncentraci 200mM.

Tab. 4 Výsledky měření jednotlivých gelů. Efektivita a intenzita (procentuální zastoupení donoru v přítomnosti akceptoru) jsou průměrné hodnoty vyhodnocené z histogramů z RET analýzy, jejichž porovnání je zobrazeno na obrázcích 35 a 36.

Vzorek	c <sub>septonex</sub> (mM)	HyA M <sub>w</sub> [kDa]	Sonda	Efektivita [%]	Intenzita [%]
1	50	340	Fluorescein	73	56
2	100			68	51
3	200			72	51
4	50	1540		57	69
5	100			62	56
6	200			67	50
7	50	340	Dio	88	25
8	100			90	35
9	200			92	50
10	50	1540		79	16
11	100			79	23
12	200			87	70

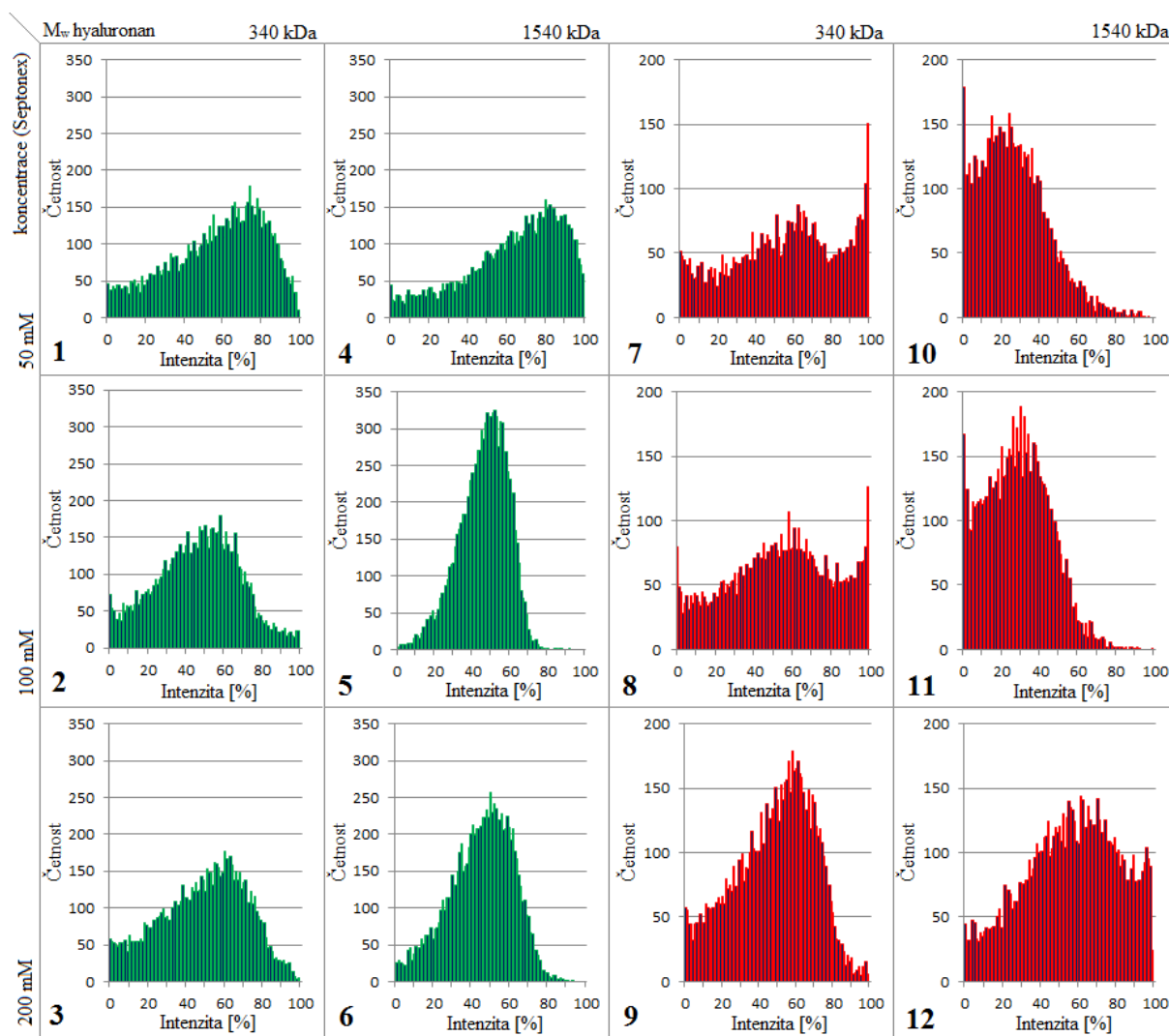
Co se intenzity, neboli zastoupení donoru v přítomnosti RET, týče, u vzorků s fluoresceinem nedochází k žádné výrazné změně, až na vzorek 4, tudíž vzorek, který se jako jediný lišil od ostatních díky vzniku shluků v tomto gelu. U gelů s DiO je zvyšující se intenzita RET dána zvyšující se koncentrací této sondy v roztoku. U vzorku 12 dochází ovšem

k silnějšímu nárůstu intenzity. Tento vzorek je opět jako jediný jiný od ostatních, neboť se zde vytvořil shluk.  $M_w$  hyaluronan



Obr. 38: Porovnání histogramů, které zobrazují rozložení efektivity RET v gelu. Číslování vzorků je dle tabulky 4.

Z následujícího porovnání histogramů efektivity RET v gelech je vidět, že rostoucí koncentrace tenzidu nemá výrazný vliv. Naproti tomu vyšší molekulová hmotnost hyaluronanu vede ke snižování efektivity. Toto je velice patrné u gelů s fluoresceinem, kde vzniká ostré zastoupení efektivity okolo 55-65%. U gelů s DiO není pozorována výrazná změna a efektivita okolo 80-90% stále převažuje. U gelů s DiO navíc toto lehké kolísání efektivity neukazuje na velkou změnu, pouze se snižuje ostré zastoupení efektivity kolem 90%. Efektivita totiž závisí na vzdálenosti donoru a akceptoru s šestou mocninou, tudíž v těchto hodnotách dochází k její změně i při velmi malých odchylkách vzdálenosti.



Obr. 39: Porovnání histogramů, které zobrazují intenzitu RET (míru vázání akceptoru na donor) v jednotlivých gelech. Číslování vzorků je jak v předchozím případě také podle tabulky 4.

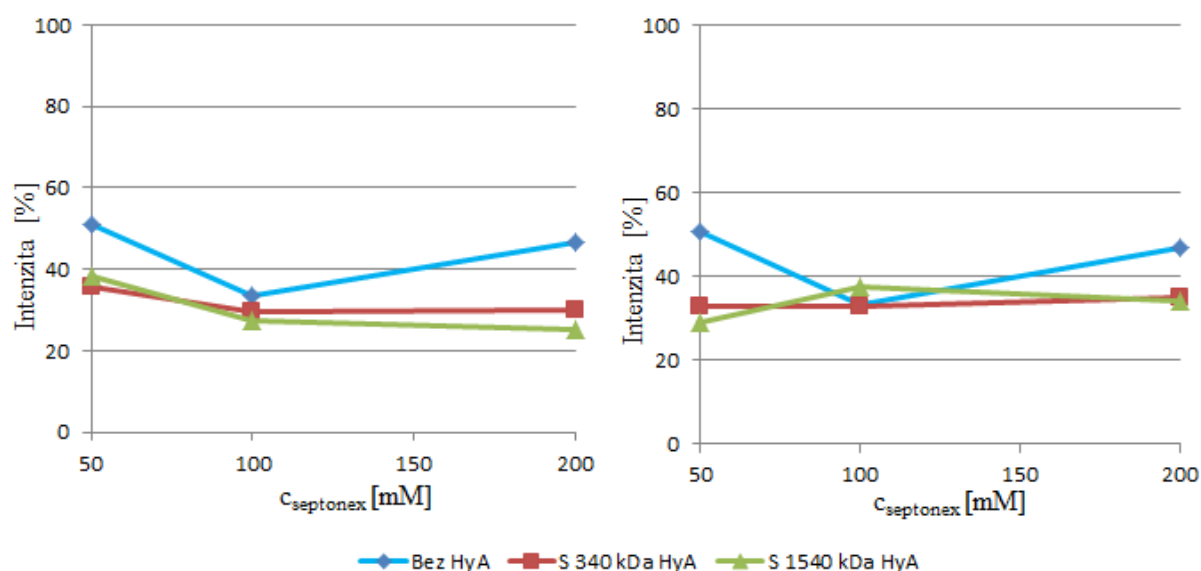
Z porovnání histogramů intenzity RET v gelech opět není patrný větší vliv koncentrace tenzidu. U gelů s fluoresceinem je vidět efekt vyšší molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu, kdy dochází ke zvýšení 40-60% intenzity, neboli tedy zastoupení donoru v přítomnosti RET, a úbytku míst, kde k RET buď nedocházelo a nebo docházelo u všech molekul donoru. Vzorek 4 se od tohoto tvrzení odchyluje, pravděpodobně z důvodu, že v něm vznikaly shluky, ve kterých z obrázku RET bylo patrné, že dochází k intenzivnímu přenosu energie, tudíž i jeho histogram má tyto hodnoty posunuté. U gelů s DiO celková intenzita s rostoucí koncentrací stoupala v důsledku vyšší koncentrace sondy. Zatímco u gelů s 340 kDa hyaluronanem můžeme pozorovat poměrně rovnoměrné rozložení intenzit, u gelů s 1540 kDa hyaluronanem dochází k rozdělení, kde RET probíhá s intenzitou maximálně 60%. Vytvořily se tedy místa, kde DiO najednou není téměř vůbec v kontaktu s perylenem.

Gely s fluoresceinem musely být vyhodnoceny triexponenciálně. Biexponenciální vyhodnocení totiž poskytovalo špatné hodnoty a statistické výsledky byly nepřesné. V gelu pravděpodobně vznikly dvě populace, kde první měla průměrnou dobu života 0,6 ns a druhá průměrnou dobu života 2,5 ns.

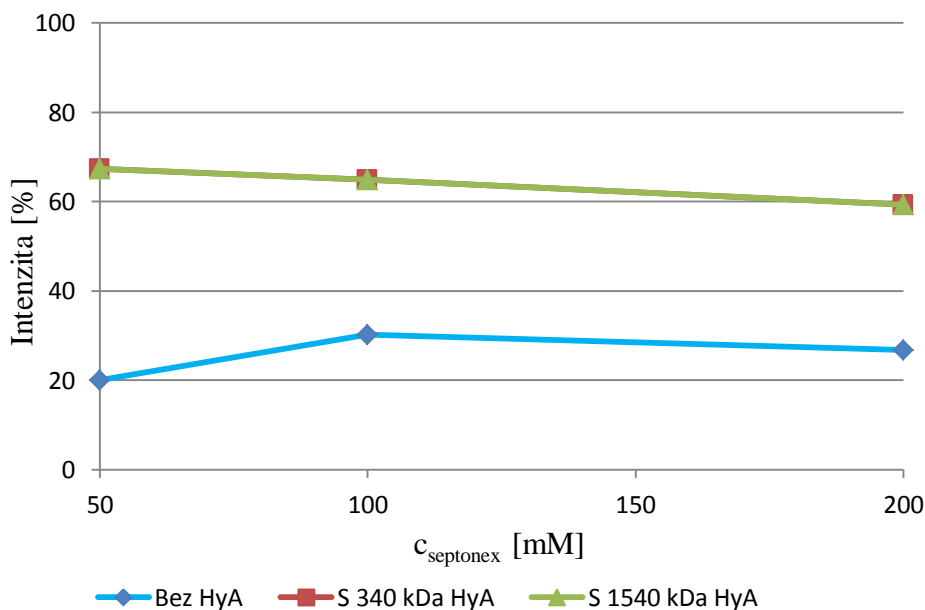
Tab. 5 Výsledky měření dvou populací v gelech s fluoresceinem.  $A_2$  a  $A_3$  značí jejich intenzitu a  $\tau_2$  a  $\tau_3$  značí jejich dobu života.

Gel	$c_{\text{septonex}}$ [mM]	HyA $M_w$	$\tau_2$ [ns]	$\tau_3$ [ns]	$A_2$ [%]	$A_3$ [%]
1	50	340 kDa	0,5	2,4	36	33
2	100		0,5	2,4	30	33
3	200		0,5	2,3	30	35
4	50	1540 kDa	0,6	2,7	38	39
5	100		0,7	2,7	28	37
6	200		0,6	2,3	25	34

Následující 3 grafy porovnávají intenzitu RET (procentuální zastoupení donoru v přítomnosti akceptoru) v gelu a roztoku, tudíž v prostředí bez hyaluronanu, s přidavkem 340 kDa a 1540 kDa hyaluronanu. Jsou porovnávány celkové intenzity RET ve vzorcích s fluoresceinem i DiO a u fluoresceinu jsou porovnávány obě i populace zvlášť.

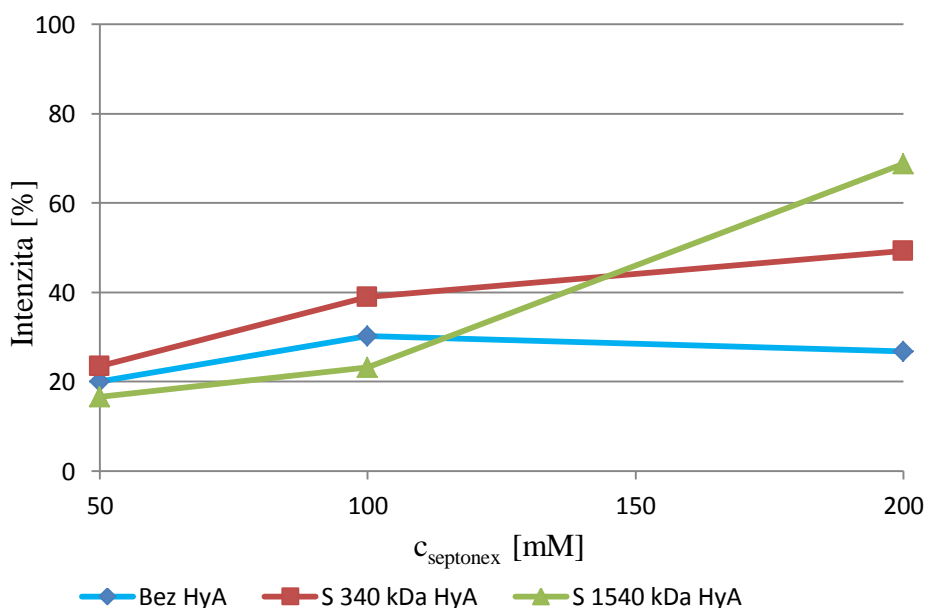


Obr. 40: Pozorování intenzity RET perylenu v přítomnosti fluoresceinu v různých prostředích u první frakce s dobou života kolem 2,5 ns a druhé frakce s dobou života kolem 0,7 ns.



Obr. 41: Pozorování celkové intenzity RET perylenu v přítomnosti fluoresceinu v různých prostředích.

Statistické hodnoty intenzity z RET analýzy gelů s fluoresceinem v tabulce 4 nejsou úplně optimální. Hodnoty jsou převzaté z programu, který umí v případě takovéto analýzy vyhodnocovat pouze dvě doby života. Teprve až při podrobnější analýze byly zjištěny hodnoty obou populací zhášeného perylenu a jsou uvedeny v tabulce 5. Je vidět, že celková intenzita RET pak zůstává při použití hyaluronanu jiné molekulové hmotnosti stejná, zatímco s rostoucí koncentrací tenzidu klesá. Dále dochází ke kolísání intenzitu jednotlivých populací, každopádně v kolísání není žádný vzorec a hodnoty se liší minimálně.



Obr. 42: Pozorování intenzity RET perylenu v přítomnosti DiO v různých prostředích s dobou života kolem 0,8 ns.

Co se týče intenzity RET perylenu v systémech s DiO je vidět její stoupající trend. Ten každopádně může být ovlivněn pouze rostoucí koncentrací DiO s rostoucí koncentrací septonexu. Přídavek nízkomolekulárního hyaluronanu efektivitu zvýšil oproti vzorkům v roztoku a vysokomolekulární hyaluronan naopak snížil. Odchyluje se pouze jedna hodnota, která je výsledkem tvorby jakéhosi shluku u vzorku, který obsahoval hyaluronan o molekulové hmotnosti 1540 kDa a který odhalila RET analýza. Což bude pravděpodobně opět nějaká nehomogenita gelu.



## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá studiem hydrogelové matrice, tvořené kationaktivním tenzidem septonexem a záporně nabitým polyelektrolytem hyaluronanem, pomocí rezonančního přenosu energie. V první části této práce byla zpracována rešerše na dané téma a na základě této rešerše navrhnout vhodný fluorescenční pár. Pro měření RET byly vybrány celkem tři sondy, a to perylen jako donor a fluorescein a DiO jako akceptor, díky vhodným vlastnostem a překryvům fluorescenčních spekter.

V experimentální části práce byl prvně měřen fluorescenční pár perylen s fluoresceinem v prostředí 0,15 M NaCl. Bylo prokázáno, že mezi těmito dvěma sondami docházelo k rezonančnímu přenosu energie. Nejprve byl tedy studován vliv koncentrace fluoresceinu na intenzitu RET, jinými slovy míru vázání akceptoru na donor, kdy bylo zjištěno, že se stoupající koncentrací fluoresceinu se zvyšuje i intenzita RET a to do maxima 22% při koncentraci 50  $\mu$ M. Dále již k zvyšování nedocházelo. Byl také pozorován časový vliv na RET od smíchání donoru a akceptoru. Bylo zjištěno, že nedochází k prakticky žádným změnám intenzity RET. Dá se tedy konstatovat, že v roztocích dochází k velmi rychlé difuzi a ustálení rovnováhy již během několika pár desítek sekund, což je doba, než vzorky byly hned po smíchání změřeny.

Byl také studován RET mezi sondami perylenem a DiO v micelárním roztoku septonexu v prostředí 0,15 M NaCl. Bylo též prokázáno, že mezi nimi dochází k RET. Zjistilo se ale, že koncentrace DiO, které byly zvoleny, nebyly příliš vhodné, protože se ukázalo, že DiO má i při vysoké koncentraci tenzidu v roztoku špatnou rozpustnost a docházelo k jeho usazování. Tento nežádoucí efekt komplikoval měření, proto tyto vzorky byly měřeny nejen na přístroji FluoroCube, ale i na přístroji MicroTime 200 pro podrobnější RET analýzu. Ta ukázala mírný nárůst intenzity RET, která byla mezi 80-85%, což je téměř čtyřnásobně, než v roztocích připravených v druhé části. Tyto výsledky tudíž nejsou spolehlivé. Efektivita zůstávala konstantní kolem 90%, což značí, že DiO se nacházelo v těsné blízkosti perylenu, tudíž pravděpodobně ve stejných micelách.

Druhou částí experimentální práce a zároveň hlavním cílem bylo měřit RET v hydrogelech pomocí fluorescenčních sond, u kterých byla potvrzena v první části experimentální práce jejich využitelnost pro tento účel. Bylo potvrzeno, že v těchto gelech dochází k přenosu energie mezi vybranými dvěma fluorescenčními páry. V případě gelů s fluoresceinem bylo zjištěno, že přídavek hyaluronanu způsobuje vznik dvou populací zhášeného donoru, které mají výrazně odlišné doby života. Došlo také ke snížení efektivity RET se zvýšenou molekulovou hmotností hyaluronanu. Na rozdíl pak od roztoku byla intenzita RET v těchto gelech několikanásobně vyšší. Gely s DiO stejně jako roztoky ukazují vysokou efektivitu RET a vyšší molekulová hmotnost hyaluronanu způsobuje její mírné snížení. Intenzita RET tohoto páru v gelech s vyšší molekulovou hmotností hyaluronanu klesá s výjimkou gelu s 200 mM koncentrací tenzidu, kde dochází k opačnému jevu.

Z výsledků tedy vyplývá, že dochází k výměně obsahu micel, jinak by u fluorescenčního páru DiO s perylenem nedocházelo k RET, protože DiO a perylen byly připraveny v micelách zvlášť a až poté smíchány dohromady. Vyšší molekulová hmotnost hyaluronanu způsobuje zvětšování micel, což způsobuje zvyšování vzdálenosti fluorescenčních párů a tudíž se snižuje efektivita RET. Druhá možnost příčiny snížení efektivity RET tkví ve změně reorientačního faktoru, který se v důsledku rigidního média snižuje. Dvě populace dob života zhášeného perylenu v přítomnosti fluoresceinu by mohly naznačovat tvorbu dvojího typu micel. První

menší a druhé větší vázané na polyelektrolytový řetězec. Větší micely by se mohly tvořit i fúzí menších micel, což byl i jeden z původních předpokladů možného chování těchto gelových systémů.

Z výsledného porovnání přídavku hyaluronanu oproti samotným roztokům lze pozorovat, že gely vykazují vyšší intenzitu fluorescence, jinak řečeno více molekul perylenu je v přítomnosti akceptorního fluoroforu. V menší míře se toto projevuje u pozorovaných systémů s DiO a ve velké míře v systémech s fluoresceinem. Přídavek hyaluronanu může tudíž způsobovat buď vyšší přístupnost micel, nebo jejich fúzi a tvorbu supermicel. Tvorba větších micel by mohla vysvětlovat zvýšenou intenzitu RET v gelech oproti roztokům s fluoresceinem díky následnému většímu povrchu micel a tudíž zvýšené pravděpodobnosti kontaktu fluoresceinu s perylenem. Stejně by to bylo i u systémů s DiO, kde větší micely v gelech by mohly pojmout vyšší množství DiO, čímž by se zvýšila pravděpodobnost RET a tudíž i množství molekul donoru, které jsou tímto efektem ovlivněny.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. Chemické listy. 1999, č. 93, s. 421-427.
- [2] HOLMBERG, K. Surfactants and polymers in aqueous solution. 2. vyd. Chichester: John Wiley, 2003, s. 1-3. ISBN 04-714-9883-1
- [3] L. Bartovská: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. 2000, 16.4.2009 [cit. 2017-01-04]. Dostupný z: <http://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/N403015.html>
- [4] Carbethopendecinii bromidum. Český lékopis 1997 [online]. [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_6\\_1\\_Carbethopendecinii\\_bromidum.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecinii_bromidum.htm)
- [5] NOVÁK, J. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 363-402. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [6] POUCHLÝ, J. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 127-168. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [7] PEPPAS, N.A., B.V. SLAUGHTER a M.A. KANZELBERGER. 9.20 – Hydrogels. Polymer Science: A Comprehensive Reference [online]. 2012, č. 9, s. 385–395 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [8] ROSIAK, J.M. a F. YOSHII. Hydrogels and their medical applications. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms [online]. 1999, č. 151 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [9] SLAUGHTER, B.V., S.S. KHURSHID, O.Z. FISHER, A. KHADEMHOSEINI a N.A. PEPPAS. Hydrogels in regenerative medicine. Advanced Materials. 2009, č. 21, s. 3307-3329. Dostupné z: <http://www.tissueeng.net/lab/papers/hydrogels%20in%20regenerative%20medicine.pdf>
- [10] SCOTT, J.E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. Glycoforum [online]. 1998 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [11] HASCALL, V.C. a T.C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and physical properties. Glycoforum [online]. 1997 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [12] GARG, H.G. a Ch.A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan [online]. 1st ed. Elsevier, 2004, s. 1-11 [cit. 2017-01-04]. ISBN 00-804-4382-6. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/chemistry-and-biology-of-hyaluronan/garg/978-0-08-044382-9>
- [13] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie. *Základy analytické chemie* [online]. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, 2007 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <http://www.sos-veseli.cz/download/zach.pdf>

- [14] Jablonski diagram. ChemWiki [online]. 2012 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical\\_Chemistry/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Jablonski\\_diagram](http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram)
- [15] Principy fluorescenční spektroskopie. FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. 2009 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [16] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. Molecular fluorescence: principles and applications. Second edition. ISBN 978-3-527-32846-8.
- [17] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, c1999. ISBN 0-306-46093-9.
- [18] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3527600248.
- [19] SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intracellular energy transfer in aqueous CTAB solutions. Journal of Luminescence [online]. 1996, 69(4), 179-186 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/S0022-2313(96)00116-0. ISSN 00222313. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [20] PicoQuant [online]. Berlín: PicoQuant, [21. století] [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.picoquant.com](http://www.picoquant.com)
- [21] CLEGG, Robert M. Fluorescence resonance energy transfer. Current Opinion in Biotechnology [online]. 1995, 6(1), 103-110 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [22] Struck, D.K., D. Hoekstra, and R.E. Pagano. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. Biochemistry. 20: 4093–4099 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [23] MIKAELSSON, Therese, Jörgen ÅDÉN, Lennart B.-Å. JOHANSSON a Pernilla WITTUNG-STAFSHEDE. Direct Observation of Protein Unfolded State Compaction in the Presence of Macromolecular Crowding. Biophysical Journal [online]. 2013, 104(3), 694-704 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349512051326>
- [24] SABANAYAGAM, Chandran R., John S. EID a Amit MELLER. Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: Corrections due to nonideal transfer. The Journal of Chemical Physics [online]. 2005, 122(6), 061103- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1063/1.1854120. ISSN 0021-9606. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/1.1854120>
- [25] BABU SEKAR, Rajesh a Ammasi PERIASAMY. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. The Journal of Cell Biology [online]. 2003, 160(5), 629-633 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://jcb.rupress.org/content/160/5/629.long>
- [26] CHEN, Xiangning, Barbara ZEHNBauer, Andreas GNIRKE a Pui-Yan KWOK. Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method.

- Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 1997, 94(20), 10756–10761 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/94/20/10756.full>
- [27] DE, Swati a Agnishwar GIRIGOSWAMI. Fluorescence resonance energy transfer—a spectroscopic probe for organized surfactant media. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2004, 271(2), 485–495 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [28] DE, Swati, Agnishwar GIRIGOSWAMIA a Anil KUMAR MANDAL. Energy transfer—a tool for probing micellar media. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2003, 59(11), 2487–2496 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [29] REULEN, Sanne W. A. a Maarten MERKX. Exchange Kinetics of Protein-Functionalized Micelles and Liposomes Studied by Förster Resonance Energy Transfer. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2010, 21(5), 860-866 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/bc900398p. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc900398p>
- [30] GHOSH, Subhadip, Shantanu DEY, Aniruddha ADHIKARI, Ujjwal MANDAL a Kankan BHATTACHARYYA. Ultrafast Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Micelle and the Gel Phase of a PEO–PPO–PEO Triblock Copolymer: Excitation Wavelength Dependence. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2007, 111(25), 7085-7091 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/jp070235y. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp070235y>
- [31] SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intramolecular energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence* [online]. 1996, 69(4), 179-186 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [32] DE OLIVEIRA, Hueder P.M a Marcelo H GEHLEN. Electronic energy transfer between fluorescent dyes with inter- and intramolecular interactions. *Chemical Physics* [online]. 2003, 290(1), 85–91 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [33] TOERNE, Kevin a Ray von WANDRUSZKA. Influence of Temperature-Induced Aggregation on Energy Transfer from a Surfactant to Micellized Perylene. *Langmuir* [online]. 2002, 18(20), 7349-7353 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/pdf/10.1021/la025750w>
- [34] PETERSON, Amberlyn M., Zhesen TAN, Evelyn M. KIMBROUGH a Jennifer M. HEEMSTRA. 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO) as a fluorogenic probe for measurement of critical micelle concentration. *Anal. Methods* [online]. 2015, 7(16), 6877-6882 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1039/C5AY01444A. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AY01444A>
- [35] MAITY, Arnab, Tarasankar DAS, Prasun GHOSH a Pradipta PURKAYASTHA. Compromise between compactness of micelle and overlap integral toward Förster resonance energy transfer from an indoloquinoline derivative to fluorescein: A fluorometric study. *Chemical Physics Letters* [online]. 2011, 508(4-6), 231-234 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.cplett.2011.04.064. ISSN 00092614. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

- [36] GEHLEN, Marcelo H. a Frans C. DE SCHRYVER. Time-Resolved Fluorescence Quenching In Micellar Assemblies. *Chem. Rev.* [online]. 1993, 93(1), 199–221 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr00017a010>
- [37] BHATTAR, S.L., G.B. KOLEKAR a S.R. PATIL. Fluorescence resonance energy transfer between perylene and riboflavin in micellar solution and analytical application on determination of vitamin B2. *Journal of Luminescence* [online]. 2008, 123(3), 306–310 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [38] AYDIN, Burcu M., Murat ACAR, Mustafa ARIK a Yavuz ONGANER. The fluorescence resonance energy transfer between dye compounds in micellar media. *Dyes and Pigments* [online]. 2009, 81(2), 156–160 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [39] CHATTERJEE, Sujan, Susantamay NANDI a Subhash Ch. BHATTACHARYA. Fluorescence resonance energy transfer from Fluorescein to Safranin T in solutions and in micellar medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2005, 173(2), 221–227 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [40] WANG, J., X. XING, X. FANG, C. ZHOU, F. HUANG, Z. WU, J. LOU a W. LIANG. Cationic amphiphilic drugs self-assemble to the core-shell interface of PEGylated phospholipid micelles and stabilize micellar structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2013, 371(2000) [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2012.0309>
- [41] DAS, Paramita, Arabinda MALLICK, Pradipta PURKAYASTHA, Basudeb HALDAR a Nitin CHATTOPADHYAY. Fluorescence resonance energy transfer from TX-100 to 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H-indolo-[2,3-a]quinolizine in premicellar and micellar environments. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2007, 130(1-3), 48-51 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.molliq.2006.04.001. ISSN 01677322. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [42] WANG, Weiwei, Huijuan SONG, Ju ZHANG, Pan LI, Chen LI, Chun WANG, Deling KONG a Qiang ZHAO. An injectable, thermosensitive and multicompartiment hydrogel for simultaneous encapsulation and independent release of a drug cocktail as an effective combination therapy platform. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, 203, 57-66 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915001157>
- [43] CHEN, H., S. KIM, L. LI, S. WANG, K. PARK a J.-X. CHENG. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, 105(18), 6596-6601 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1073/pnas.0707046105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373326/>
- [44] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, Tomáš MUTHNÝ, Kristina NEŠPOROVÁ, et al. Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery. *Carbohydrate Polymers*

- [online]. 2017, 156, 86-96 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.013. ISSN 01448617. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [45] CHEN, Hongtao, Sungwon KIM, Wei HE, Haifeng WANG, Philip S. LOW, Kinam PARK a Ji-Xin CHENG. Fast Release of Lipophilic Agents from Circulating PEG-PDLLA Micelles Revealed by in ViWo Förster Resonance Energy Transfer Imaging. *Langmuir* [online]. 2008, 24(10), 5213-5217 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257595>
- [46] JIWPANICH, Siriporn, Ja-Hyoung RYU, Sean BICKERTON a S. THAYUMANAVAN. Noncovalent Encapsulation Stabilities in Supramolecular Nanoassemblies. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2010, 132(31), 10683-10685 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1021/ja105059g. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja105059g>
- [47] SearchLight. *Semrock* [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <https://searchlight.semrock.com/>
- [48] SJÖBACK, Robert, Jan NYGREN a Mikael KUBISTA. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta: Part A* [online]. 1995, **51**(6), L7-L21 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/0584-8539(95)01421-P. ISBN 10.1016/0584-8539(95)01421-P. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [49] Fluorescein, Oregon Green and Rhodamine Green Dyes—Section 1.5. *The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* [online]. 11th ed. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation, 2010 [cit. 2017-04-23]. ISBN 0982927916. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home.html>
- [50] Dialkylcarbocyanine and Dialkylaminostyryl Probes—Section 13.4. *The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* [online]. 11th ed. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation, 2010 [cit. 2017-04-23]. ISBN 0982927916. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home.html>

## 8 POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1. Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Význam</b>
RET	rezonanční přenos energie
CMC	kritická micelární koncentrace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
UV	ultrafialová část elektromagnetického spektra
UV-VIS	ultrafialová a viditelná část elektromagnetického spektra
Da	dalton ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
HyA	kyselina hyaluronová
M	molekula donoru
M*	excitovaná molekula donoru
Q	molekula zhášече
NBD	nitrobenzoxadiazol
ROX	rhodamin X
TAMRA	karboxytetrametylrhodamin
DiO	3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát
DiI	1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetrametylindokarbokyanin perchlorát

### 8.2. Seznam symbolů

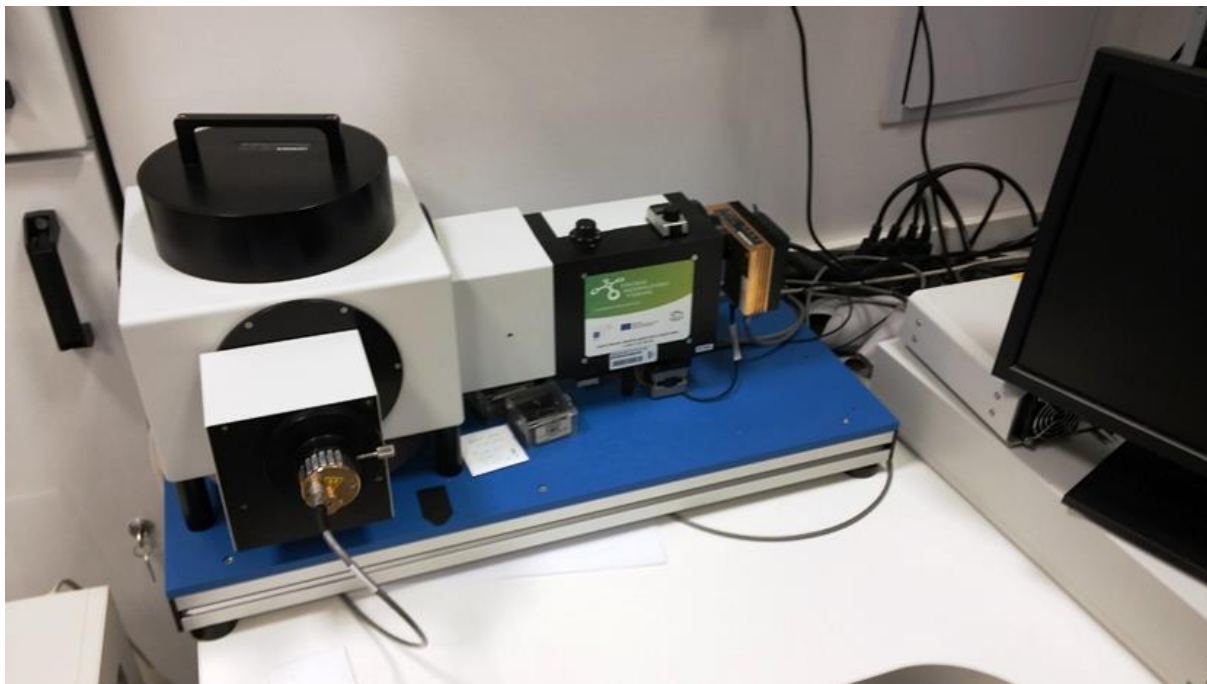
<b>Symbol</b>	<b>Význam</b>
$M_w$	molekulová hmotnost
c	koncentrace
nm	nanometr
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
$A_1$	Procentuální intenzita fluorescence donoru
$A_2$	Procentuální intenzita RET
$A_3$	Procentuální intenzita RET druhé populace
$\tau_1$	doba života donoru
$\tau_2$	doba života zhášeného donoru
$\tau_3$	doba života druhé populace donoru v přítomnosti akceptoru
$S_1$	první singletový excitovaný stav molekuly
$S_2$	druhý singletový excitovaný stav molekuly
$T_1$	první tripletový excitovaný stav molekuly
$T_2$	druhý tripletový excitovaný stav molekuly



## **9 SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha 1.           Přístroj FluoroCube.
- Příloha 2.           Přístroj MicroTime 200.
- Příloha 3.           Přístroj HITACHI U-3900H
- Příloha 4.           Ukázka měřených hydrogelů s přidavkem 340 kDa hyaluronanu.
- Příloha 5.           Ukázka měřených hydrogelů s přidavkem 1540 kDa hyaluronanu.

## 10 PŘÍLOHY



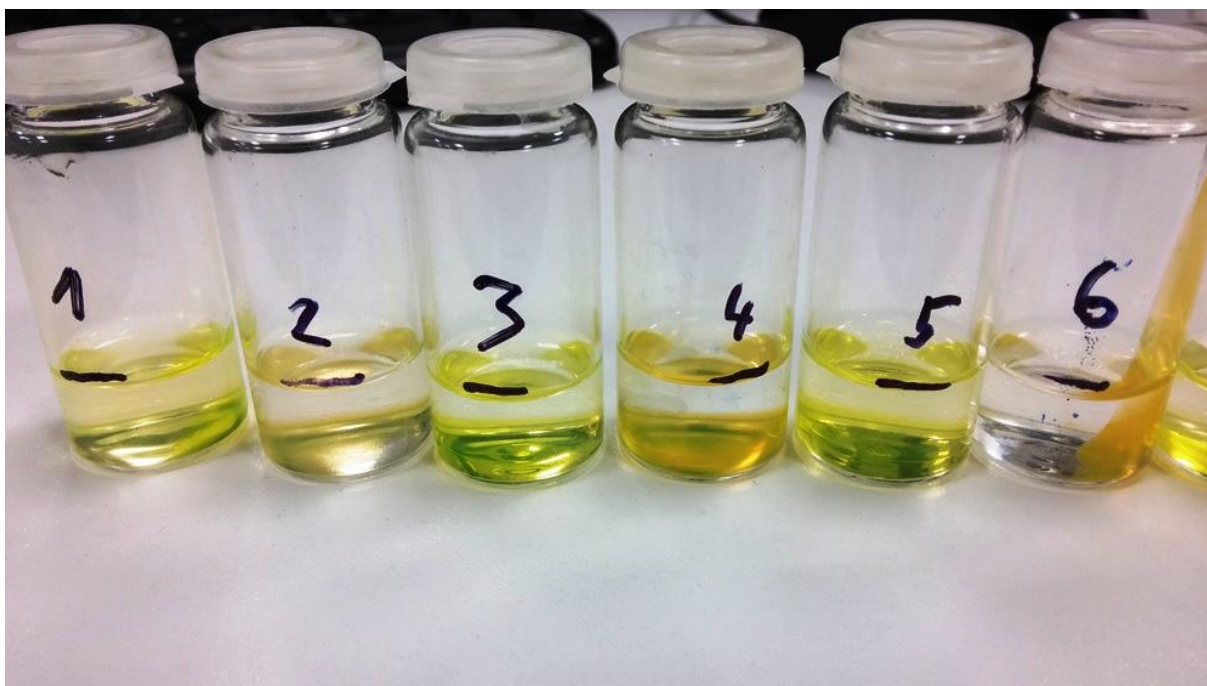
*Příloha 1. Přístroj FluoroCube.*



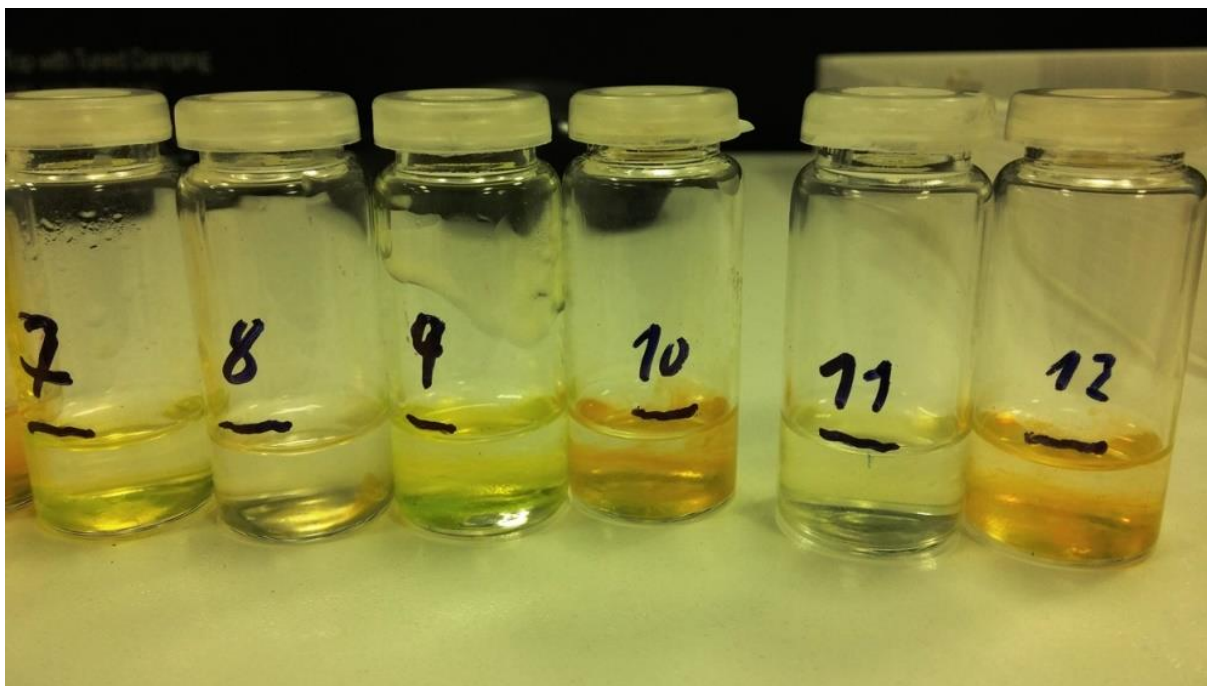
*Příloha 2. Přístroj MicroTime 200.*



*Příloha 3. Přístroj HITACHI U-3900H*



*Příloha 4. Ukázka měřených hydrogelů s přidavkem 340 kDa hyaluronanu.*



*Příloha 5. Ukázka měřených hydrogelů s přidavkem 1540 kDa hyaluronanu.*